



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112014002817-6 A2



(22) Data do Depósito: 08/08/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2021

(54) Título: USO DE UM POLIPEPTÍDEO P62, OU DE UM ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA P62

(51) Int. Cl.: A61K 38/17; A61K 38/16; A61K 48/00; A61K 39/395; A61K 9/20; (...).

(30) Prioridade Unionista: 08/08/2011 US 61/521,280.

(71) Depositante(es): CURELAB ONCOLOGY, INC.

(72) Inventor(es): ALEXANDER SHNEIDER; FRANCO VENANZI; VICTOR SHIFRIN; MICHAEL SHERMAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2012050024 de 08/08/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/022991 de 14/02/2013

(85) Data da Fase Nacional: 05/02/2014

(57) Resumo: USO DE UM POLIPEPTÍDEO P62, OU DE UM ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA P62. São fornecidas aqui novas composições de p62 para a profilaxia e tratamento de câncer e usos relacionados. A invenção também fornece composições de p62 modificadas que aumentam a atividade anticâncer de p62.

```

1 cctctcaggg cggggggggg cctccgggtt cgttaccaaa gcccgggggg gggctggagcc
43 ggggggggg gttctccggg agttccgggg tggctagggg gctgctcaac ggggggctt
121 cctctctggg caagagagag cggggggggg agatttcggg cttcagtttc tggctggagcc
181 cggagcttga gggggggggg aggttggggg cgggttgggg acctctggag cggggcttga
241 gcccgggggg gggcctgggt cccggggggg gggcttgggg cttccagggg caactaccga
301 atggagaggg ggaactgggt gctttttcca gtaacggggg attgacaaag gctactgctct
361 acgtgagaga tggactcttc ggaacttcca ttaagggaga aaagagatgg aggggggctt
421 acggccagcc gtttggctgg gggggggggg gcaacagcgt gcaaccctat gtaactctgg
481 atgctgagaa tggactcttc ggaacagccc gtaacaaagg gtaactcttc ggaactcttc
541 acttggtag cgtctgggg ggaaggggtt tgcaccgggg gcaaccagag ctcgactctc
601 caagcctctc gggggggggg tctgagggct tcccagagag cagctggctc ggaactcttc
661 aaagagagaa cttggggggg ccaagatggg aaatggggcc acagagaaac tggagcccaac
721 gctccctctg tggagagagc gggccctctc gttccagggg ggaactcttc tctggctaat
781 gggagatctc gacttggggt tctctgagaa agtttgggga agtttgggga gttgacctta
841 gctccctctg cttgagaggt gactctgaga tggagagagc agagagagaa agggctgaga
901 cctccctctc tccagagagc tccagagagc agggagagag cagctctcag ccaagagagc
961 gttcctctga cctccagagc ccaagatgga atctctgagc gttccagagc tctctggggg
1021 agagagagag gaaagctggc ttggagagag agggggggcc tggagagagc atggagctgg
1081 ataaacttga agggagagat gactcttga ccaacttgg ttaaaagag cttctggggg
1141 ctacagagta actccagctc ctacagagc caagatctga agggagagc tctctggagc
1201 cctccagagc aggtccagag gggctctgag aagctggctt gtaaccatct cttccggagc
1261 aggtcagcc gggctggtt ggtctctct ccaagatgct gttcctgggg tctctgagt
1321 aaagggggta gttccagag cttctggag ccaagatcta tggactctga gggctctgg
1381 caaccctctc gttctcaag caaccctggc agtttggc acttcttc acctctctg
1441 ggtccctctc tttgtctca taatttgggt aagtttgggt agaatctag gttctctctc
1501 gggcagctt cttctctctc ttcagactt aggtttag agttcaag caactctgag
1561 cagcaaaaca agttccagc agggggggct cctgtgtgtg tgtgtgtgta tgttctctg
1621 gttccctctg tctctggag agttctgag cttccagctc caagatctga tggagagag
1681 tctgacctcc tctctggag ggttaagtta gcaagcagac acaatagctg ctaactctg
1741 ttaactctc cttctctct aaatgacta tggctctctc caactagctt gactctctc
1801 tggctcagag cttgacact ctgatttag ataaagtag cctaggggtt gttccagagc
1861 aggtctgag gttccagct gttccagctc tggctctctc ggaagctctc agaaagctga
1921 tctgcaagt tggtttcaat gaaagctgc tctgtgtctc ttcaccctg tggttctctc
1981 atttcaaac cttctctctc tttcaacta agatctctt gttctctctc tttcaactc
2041 gtaaacactc taatlaaac gtaicagcc ttaaacatc gacttctga tagagagaaa
2101 tggctcagc taatttctc tttcaactc ttaaacatc acttctaa gttctctg
2161 gtaaacctct cctctctaac agtttctctc cgttaataa cctgcaactc cagatctca
2221 caactctc gactctctc caatttaa aggtctctc tggctctctc gttctctctc
2281 tcttctctc agagcagag gttccactct cttccaggg agttctctg tctctctg
2341 tctctctca aggtctctc gaccagatc tggaggggtt tgggtctga gaaactctga
2401 caagggagc aggtctctc aggtctctc tggaggggtt tgggtctga gttctctg
2461 tagctctgag tggaccactc ggtctctctc cctctctgag agactctctg tggctctctc
2521 caaatctga acttctctc agttctctc caactctgag caactctctc gactctctc
2581 taactctgag gatgggctc caagctctc tccagagcc cctcagctc cggcagctc
2641 aggtctctga tttctctga agggagagc tgggtctctc tttctctc caactctctc
2701 cagctctc ctgaagagc agttgggct cctctctgag tttctctc atgctctctc
2761 caagagagc cgtctctc gttctctc tgggtctctc tctgtctctc caactctctc
2821 ctgagagctc tcaagctctc caagctctc atttctctc tttctctc caagagagc
2881 aactctctc cctctctc caaaaaaa aaaaaaaa aaa (SEQ. ID. NO. 1)

```

**USO DE UM POLIPEPTÍDEO P62, OU DE UM ÁCIDO NUCLEICO QUE
CODIFICA P62**

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº. de série 61/521.280 depositado em 8 de agosto de 2011, intitulado "P62 as an Anti-Cancer Agent", Pedido de Patente Russo Nº. de série 2012108927 depositado em 11 de março de 2012, que são aqui incorporados por referência na sua totalidade e para todos os efeitos.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] Esta invenção refere-se geralmente ao campo da prevenção e tratamento do câncer. Mais especificamente, a invenção refere-se à prevenção e ao tratamento do câncer por meio de ativação de resposta anticâncer com o uso de composições de p62.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] O câncer é a segunda causa mais comum de morte nos Estados Unidos e da União Europeia (National Vital Statistics Reports, Vol. 60, No. 4, 2012) e a primeira causa de morte mais comum entre pessoas de 45 a 64, para homens e mulheres, na União Europeia. A prevalência de câncer estimada nos Estados Unidos em 1 de janeiro de 2008 foi de 5.506.000 casos de tumores invasivos para o sexo masculino e 6.452.000 casos para o sexo feminino.

[0004] Vacinas contra o câncer estão sob investigação, com algumas em estudos de eficácia de Fase III (Rosenberg et al., Nat Med., 10:909 (2004), Johnson et al., Expert Rev Anticancer Ther., 9:67 (2009)3,4). Várias vacinas contra o câncer são dirigidas contra tumores sólidos-melanoma, cânceres de próstata, pulmão, mama e colorretal. Duas

populações de alto risco beneficiarão especialmente de vacinas preventivas antiâncer: os pacientes com tumores removidos cirurgicamente pertencentes aos tipos de câncer que são conhecidos por terem um elevado potencial metastático (por exemplo, de ovário ou alguns tipos de câncer de mama) e também os portadores de mutações conhecidas associadas com o risco de câncer mais elevado (por exemplo, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 para cânceres da mama e de ovário, o gene RAD51 para o câncer do ovário, etc.). A vacinação preventiva seletiva de coorte de alto risco das mulheres é uma tarefa de saúde pública importante.

[0005] A p62 é uma proteína multifuncional que se liga à ubiquitina e regula a ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa-B (NF-kB). A proteína funciona como uma proteína de suporte/adaptadora em conjunto com o fator 6 associado ao receptor do TNF para mediar a ativação do NF-kB em resposta a sinais a montante. Alternativamente, as variantes de transcritos de splicing que codificam, quer as mesmas isoformas ou isoformas diferentes foram identificadas por este gene.

[0006] A p62 foi identificada como a proteína de 62 kDa, que estava ligando o domínio de homologia src 2 (SH2) de tirosina quinase Lckp56 de uma forma independente de fosfotirosina (Parket al., Proc Natl Acad Sci U S A., 92:12338 (1995)). A sequência primária de p62 é conhecida (Joung et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 93:5991, (1996)), e foi demonstrado que se liga à ubiquitina (Vadlamudi et al., J. Biol. Chem., 271:20235 (1996)). A sequência de DNA de p62 humana, sequestosome 1 de Homo sapiens (SQSTM1),

variante de transcrito 1, mRNA, pode ser acessado na Sequence de Referência de NCBI: NM_003900.4. A sequência de aminoácidos da p62 humana, isoforma 1 de sequestosome-1 [Homo sapiens], pode ser acessado na sequência de referência de NCBI: NP_003891.1. A p62 não tem homologia nem com hidrolases de ubiquitina C-terminal, nem com a subunidade S5a do complexo de proteassoma 26 S, as únicas proteínas conhecidas por se ligarem de forma não covalente à ubiquitina. Estes resultados sugerem que a p62 pertence a uma nova classe de proteínas de ligação de ubiquitina.

[0007] A p62 é um componente de corpos de inclusão encontrada em doenças de agregação de proteínas no cérebro e no fígado: a p62 é sequestrada em corpos de inclusão citoplasmáticos, chamados sequestosomes. Estes agregados de proteínas contendo p62 são degradados por autofagia. Sugeriu-se que esta função de p62 pode ter um efeito protetor sobre a morte celular induzida por huntingtina (Bjørkøy et al., J Cell Biol., 171:603 (2005)). As mutações no gene p62 têm sido associadas com a doença de Paget familiar e esporádica (Jenny Chung et al., Semin Arthritis Rheum., 41:619 (2012)), uma doença óssea metabólica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] São fornecidos aqui Usos para tratar, aliviar, melhorar, atenuar, retardar o início de, inibir a progressão de, reduzir a gravidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas de um câncer em um sujeito por administração ao um sujeito de um agente tendo (a) um polipeptídeo de p62, ou (b) um ácido nucleico que codifica p62. O agente pode ter (a) uma ou mais deleções de domínio, (b) um ácido nucleico que codifica p62, que é pelo

menos 95% idêntico à SEQ ID NO: 1, ou (c) um polipeptídeo de p62, que é pelo menos 98% idêntico à SEQ ID NO: 2. As deleções de domínio do Uso podem ser uma ou mais das seguintes: B1, ZZ, NLS2, TB, NLS1, NES, LIR, KIR, e UBA. O Uso pode utilizar um polipeptídeo de fusão ou ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de fusão, respectivamente. O Uso pode utilizar um polipeptídeo de p62, que é modificado após a tradução.

[0009] O agente pode ser administrado por qualquer uma das seguintes vias: via parenteral, oral, nasal, retal, transdérmica, intravaginal ou inalação através de um aerossol. As vias parentéricas podem ser qualquer uma das seguintes: por via intravascular, por via intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intradérmica e subcutânea, ou podem ser administradas a um órgão ou a um tumor. O Uso pode ainda incluir quaisquer e todos os seguintes: administração de adjuvantes, administração dos componentes copotencializadores, a administração de uma ou mais moléculas que bloqueiam mecanismos imunes reguladores supressivos ou negativos, ou a administração de uma ou mais terapias anticâncer ao referido sujeito.

[0010] O Uso pode ser usado para tratar qualquer câncer em um sujeito incluindo: câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer de estômago, câncer colorretal, câncer de pele, um câncer de cabeça e pescoço, câncer de brônquios, câncer pancreático, câncer de bexiga urinária, câncer cerebral, câncer do sistema nervoso central, câncer do sistema nervoso periférico, câncer de esôfago, câncer da cavidade oral ou faringe, câncer de

fígado, câncer de rim, câncer testicular, câncer do trato biliar, câncer do intestino delgado ou do apêndice, câncer de ovário, câncer de útero, câncer da glândula salivar, câncer de tireóide, câncer da glândula adrenal, osteossarcoma, condrossarcoma, sarcoma e câncer de tecidos hematológicos. O sujeito pode ser: um sujeito diagnosticado com câncer, um sujeito previamente tratado para o câncer, um sujeito com uma história familiar de câncer, ou um sujeito com predisposição ao câncer.

[0011] O Uso pode incluir um agente que é um ácido nucleico que codifica p62 e o ácido nucleico pode ser incluído em um plasmídeo ou um vetor viral. O Uso também pode incluir uma estratégia para melhorar a eficiência de imunização à base de ácido nucleico.

[0012] São também fornecidos aqui agentes para tratar, aliviar, melhorar, atenuar, retardar o início de, inibir a progressão de, reduzir a gravidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas de um câncer em um sujeito que é de um polipeptídeo de p62 ou um ácido nucleico que codifica p62, que tem pelo menos uma ou mais deleções de domínio, ou composto de um ou mais domínios de polipeptídeo de p62 ou um ácido nucleico que codifica um ou mais domínios de p62. O um ou mais domínio pode estar entre os seguintes: PB1, ZZ, NLS2, TB, NLS1, NES, LIR, KIR, e UBA.

[0013] O agente pode incluir um polipeptídeo de fusão ou de ácido nucleico de codificação, respectivamente. O polipeptídeo de p62 pode ser modificada pós-transducionalmente.

[0014] O agente pode ainda incluir um ou mais

adjuvantes, um ou mais componentes copotencializadores, ou uma ou mais moléculas que bloqueiam os mecanismos imunes supressores ou reguladores negativos, uma ou mais moléculas quimioterápicas ou uma moléculas de antiangiogênicos.

[0015] O agente pode ser um ácido nucleico que codifica p62, ainda, que é um componente de um plasmídeo ou um vetor viral.

[0016] Também são aqui fornecidas composições incluindo o agente adequado para administração a um sujeito.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] A FIG. 1 mostra uma sequência de ácido nucleico do tipo selvagem de p62 humana (SEQ ID NO: 1).

[0018] A FIG. 2 mostra uma sequência de aminoácidos do tipo selvagem de p62 humana codificada pela sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 2).

[0019] A FIG. 3 mostra um desenho da estrutura de domínio da p62 humana.

[0020] A FIG. 4 mostra uma comparação de um curso temporal de formação do tumor em um modelo de câncer da mama de camundongo para os camundongos injetados com uma vacina de DNA de qualquer p62, HER2 (controle positivo), ou vetor por si só (controle negativo).

[0021] A FIG. 5 mostra a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE) de tumores de animais imunizados com p62. O painel superior: setas apontam para múltiplos focos de necrose. O painel inferior: setas apontam para uma malha de células inflamatórias.

[0022] A FIG. 6 mostra a coloração imuno-histoquímica de tumores a partir de HER2 e animais imunizados com p62.

Painéis da esquerda mostram coloração com HE, painéis centrais mostram coloração com anti-CD3, e painéis da direita mostram coloração com anti-CD11b.

[0023] A FIG. 7 mostra uma linha do tempo gráfica de administração da vacina de DNA de p62 em um modelo de câncer de mama de rato T5:

[0024] A FIG. 8 mostra um curso temporal do volume do tumor em ratos de controle e vacinados com p62 com carcinoma de mama transplantável T5.

[0025] A FIG. 9 mostra um curso temporal da inibição do crescimento do tumor em ratos vacinados com p62 e de controle com o carcinoma de mama transplantável T5.

[0026] A FIG. 10 mostra o curso temporal de sobrevivência de ratos em ratos vacinados com p62 e de controle com o carcinoma de mama transplantável T5.

[0027] A FIG. 11 mostra seções de tumor de ratos vacinados com p62 e vetor de controle com carcinoma de mama transplantável T5.

[0028] A FIG. 12 mostra a coloração com Hematoxilina & Eosina (HE) de seções de tumor de ratos vacinados com p62 e com vetores de controle com carcinoma de mama transplantável T5.

[0029] A FIG. 13 mostra uma comparação entre o número de metástases do Carcinoma do Pulmão de Lewis entre camundongos vacinados com p62- e vetor de controle.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0030] São fornecidos aqui Usos e composições de p62 para o tratamento de câncer. Embora não desejando serem suportados por qualquer teoria, os inventores descobriram que através da administração de ácido nucleico que codifica

p62 a um sujeito o mecanismo de defesa imune do hospedeiro é estimulado para atacar as células neoplásicas. Conseqüentemente as vacinas de DNA que codificam um polipeptídeo de p62 ou, polipeptídeos de p62, administradas a um sujeito podem estimular uma resposta imune anticancerosa.

[0031] Tal como usado aqui, "polipeptídeo de p62" significa um polipeptídeo correspondente à proteína de p62/SQSTM1 de comprimento completo. O termo inclui todos os homólogos, análogos, fragmentos ou derivados da proteína p62/SQSTM1. Em uma modalidade, o polipeptídeo isolado de p62 tem uma seqüência de aminoácidos como mostrada na FIG. 2 (SEQ ID NO: 2). Um "ácido nucleico que codifica p62" significa um DNA ou RNA que codifica um polipeptídeo de p62.

[0032] Em algumas modalidades, o sujeito é um humano. Em outras modalidades, o sujeito é um mamífero não humano, por exemplo, um cavalo, vaca, ovelha, porco, veado, cão, gato, rato, ou um camundongo.

[0033] Em adição à seqüência de aminoácidos de comprimento completo, os polipeptídeos da presente invenção podem também incluir fragmentos ou truncamentos, análogos e homólogos do polipeptídeo de p62 e truncamentos destes como aqui descritos. Os fragmentos podem incluir peptídeos de pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25 ou pelo menos 30 resíduos de aminoácidos do polipeptídeo de comprimento completo.

[0034] As deleções de um ou mais aminoácidos, ou porções discretas a partir da seqüência de aminoácidos da proteína de p62/SQSTM1 também estão incluídas. Os

aminoácidos eliminados podem ou não ser contíguos. O comprimento do limite inferior do análogo resultante com uma mutação de deleção é de cerca de 10, cerca de 20, cerca de 50, ou cerca de 100 aminoácidos.

[0035] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de p62 tem um ou mais domínios excluídos. Embora não desejando serem suportados por qualquer teoria, os inventores afirmam que a deleção de um ou mais domínios do polipeptídeo de p62 fornece um polipeptídeo mais compacto e manipulável para dirigir uma resposta imune. Por exemplo, ao interromper ou eliminar um ou mais dos domínios de um polipeptídeo de p62, a imunogenicidade pode ser retida (ou melhorada se o domínio deletado ou interrompido não contribui para imunogenicidade) em uma molécula mais compacta e pode aumentar potencialmente o número de epítomos apresentados para hospedar anticorpos em uma base por peso. Além disso, a remoção ou reordenamento de domínios responsáveis por envolvimento com outros processos celulares ou sua própria degradação da proteína intracelular pode melhorar seu efeito anticancerígeno. O polipeptídeo de p62 tem uma estrutura de domínio, tal como prevista na Tabela 1 abaixo e como mostrada na FIG. 3:

Tabela 1. Estrutura de Domínio de Polipeptídica de p62

Domínio/ Sítio	Nome completo	Local	Descrição
PB1	Domínio Phox/Bemlp (=domínio OPR)	20-102	<p>Domínio-PB1 é conservado entre os eucariontes (protista, plantas, fungos e animais) tem dobra β-grasp tipo ubiquitina específica de domínio-PB1. Existem 3 tipos de Domínios - PB1: domínios tipo I contêm motivo-OPCA ácido, domínios tipo II contêm resíduo Lys conservador na primeira β-folha e domínios de tipo I/II contêm as opções acima. O motivo-OPCA pode ligar-se a aminoácidos básicos (por exemplo, lisina) por meio de pontes de sal, permitindo a capacidade de Domínios-PB1 para formar estruturas heteroméricas (Sumimoto et al., 2007 <i>Sci STKE.</i>, 401:6 (2007)). Domínio-PB1 de p62 é do tipo I / II (Lamark et al., 2003 <i>J Biol Chem.</i>, 278:34568 (2003)).</p> <p>Domínio-PB1 é responsável por di- e multimerização de p62, bem como a interação com outras proteínas: MEKK3, MEK5, PKCζ, PKCλ_1 (proteínas quinases contendo domínio-PB1), NBR1 (Próximo ao BRCA1, contém Domínio-PB1) (Nezis, Stenmark, 2011 <i>Antioxid Signal Redox.</i>, 17:786 (2011)).</p>

ZZ	Dedo de Zn ²⁺ tipo ZZ	122-167	O domínio ZZ é dedo de Zn ²⁺ do tipo C2H2. Domínio-ZZ de p62 se liga à RIP1 (proteína 1 de interação com receptor). RIP1 é uma proteína quinase reguladora que integra vias de sinalização ativadas por uma infecção bacteriana ou viral (através de PAMP), receptores de morte, ou genotoxinas, que participa na determinação do destino celular (sobrevivência, apoptose ou necrose) (Festjens et al., Cell Death Differ., 14:400 (2007)).
NLS2	Sinal 2 de localização nuclear	183-194	Sinal de localização nuclear tentativo (Pankiv et al., J Biol Chem., 285:5941 (2009))
TB	Domínio de ligação TRAF6	228-233	p62 se liga através do domínio TB de proteína ligase de ubiquitina E3 TRAF6. TRAF6 ativa quinase TAK1, poliubiquitinando a mesma via K63. TRAF6 participa na sinalização de RANK-L, IL-1R, TCR, BCR e receptores de β -TGF (LANDSTRÖM, Int. J Biochem Cell Biol., 42:585 (2010)). Interação de p62 com TRAF6 estimula a autoubiquitinação de atividade de TRAF6 N E3-ligase. Este processo requer os domínios de PB1- e UBA- (Moscat et al., Mol Cell., 23:631 (2006)).

NLS1	Sinal de localização	261-273	Sinal de localização nuclear Tentativo (Pankiv et al., 2009)
NES	Sinal de exportação	303-321	Tentative Sinal de exportação nuclear tentativo (Pankiv et al., 2009)
LIR	Região de interação LC3	321-342	Domínio-LIR é necessário para a ligação de proteína p62 a LC3 (cadeia leve 3 de proteína 1 associada a microtúbulo humano de tipo selvagem, Cadeia Leve 3) (Pankiv et al., J Biol Chem., 282:24131 (2007) proteína tipo ubiquitina LC3, conjugando com fosfatidil etanolamina da membrana de autofagossoma (Tanida, Microbiol Immunol., 55:1 (2011)). A interação da via de P62 com LC3, p62 é recrutada para autofagossomas (Shvets et al., autofagia, 7:683 (2011)), aparentemente transportando proteínas ubiquitinadas associadas com o domínio UBA.

KIR	Região de interação de Keap1	343-357	Domínio KIR é necessário para a interação com o domínio DC da proteína Keap1, contendo repetições kelch (Komatsu et al., Nat Cell Biol., 12:213 (2010)). Keap1 (proteína associada com ECH tipo Kelch) é um regulador da atividade do fator de transcrição Nrf2 (fator 2 relacionado a NF-E2). Nrf2 regula a expressão de genes envolvidos na síntese de glutathiona, desintoxicação de ROS, metabolismo de xenobióticos e o transporte de fármaco (Taguchi et al., Genes Cells, 16:123 (2011)). A superexpressão de p62 desloca Nrf2 de Keap1, Nrf2 é estabilizado o que leva à estimulação da expressão de genes dependentes de Nrf2. Paradoxalmente, hiperativação de Nrf2 e superexpressão de genes considerados "citoprotetivos" causa a patologia grave (Komatsu et al., 2010).
-----	------------------------------	---------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>UBA Domínio associado a Ubiquitinaçã o</p>	389-434	<p>Domínio-UBA é um dos domínios que podem se ligar a marcações poliubiquitinadas (junto com CUE, UIM, NZF etc.) Os domínios UBA podem ser divididos em quatro classes, dependendo de sua capacidade de se ligar a marcações de poliubiquitina de diferentes estruturas (K6, K29, K48, K63). Domínio-UBA de p62 pertence à classe 4, que consiste em domínios com igual afinidade para ligação a K6, K29, K48, K63 (Raasi et al. Nat Struct Mol Biol., 12:708 (2005)). Domínio-UBA também participa da dimerização de p62 (Garner et al., Biochemistry, 50:9076 (2011)). A maioria das mutações associadas à doença de Paget está localizada no domínio UBA (Yan Jenny Chung, Van Hul, Semin Arthritis Rheum, 4:619 (2011)). No entanto, as mutações de p62 não são suficientes para os osteoblastos adquirirem o fenótipo de Paget específico: A expressão da proteína da nucleocápsídeo do vírus do sarampo também é necessária (Singer, Metab celular, 13:05 (2011)). A estrutura do domínio-UBA é bem estudada (Isogai et al., J Biol Chem, 286:31864 (2011)).</p>
--	-----------------------------------------------------------	---------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Numeração de Sequência: NP_003891 (isoforma 1 de sequestosome-1 [Homo sapiens]).

[0036] Em algumas modalidades, um ou mais dos domínios acima são deletados de um polipeptídeo de p62 em códons correspondentes para as regiões de ácido nucleico do ácido nucleico de p62 (deleções na estrutura), como apresentado a seguir na Tabela 2.

Tabela 2. Deleções em p62

Domínio deletado	Começo da Deleção, entre nts	Fim da deleção, entre nts
PB1	1 e 20	102 e 122
ZZ	102 e 122	167 e 183
NLS2	167 e 183	194 e 228
TB	194 e 228	233 e 261
NLS1	233 e 261	273 e 303
NES-LIR-KIR	273 e 303	357 e 389
UBA	Códon de parada entre 357 e 389	Não aplicável

Números de nucleotídeos se referem à sequência de referência p62 NCBI NP_003891 (isoforma 1 de sequestosome-1 [Homo sapiens]).

[0037] Por exemplo, qualquer deleção da sequência de ácido nucleico de codificação que começa no nucleotídeo 102 até o nucleotídeo 122 e termina em 167 até 183 é considerada uma deleção ZZ. Portanto, por exemplo, 110-175 um é uma deleção ZZ. As técnicas para a criação de deleções na estrutura são bem conhecidas pelos versados na técnica.

[0038] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de p62

(ou o polipeptídeo de p62 codificado por um ácido nucleico) é composto de um ou mais dos domínios acima. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de p62 (ou o polipeptídeo de p62 codificado por um ácido nucleico) é composto por dois ou mais dos domínios acima referidos e ainda em outras modalidades, os domínios que são de composição do polipeptídeo estão em uma forma de N-terminal para C-terminal diferente da apresentada no polipeptídeo de p62 do tipo selvagem.

[0039] Tal como usado aqui, "biologicamente ativo ou imunologicamente ativo" refere-se a polipeptídeos de acordo com a presente invenção que têm uma função estrutural semelhante (mas não necessariamente no mesmo grau) e/ou a função reguladora semelhante (mas não necessariamente no mesmo grau) e/ou a função bioquímica semelhante (mas não necessariamente no mesmo grau) e/ou a atividade imunológica (mas não necessariamente no mesmo grau) como os polipeptídeos do tipo selvagem individuais.

[0040] Tal como usado aqui, uma "deleção" é definida como uma alteração na sequência de aminoácidos em que um ou mais resíduos de aminoácidos estão ausentes, em comparação com a proteína do tipo selvagem.

[0041] Tal como usado aqui uma "inserção" ou "adição" é uma alteração em uma sequência de aminoácidos que resultou na adição de um ou mais resíduos de aminoácidos, em comparação com a proteína do tipo selvagem.

[0042] Tal como aqui usado "substituição" resulta da substituição de um ou mais aminoácidos por aminoácidos diferentes, respectivamente, em comparação com a proteína do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a substituição de

mutação é C145R ou Q418R.

[0043] Tal como usado aqui, o termo "variante" significa qualquer polipeptídeo tendo uma substituição, deleção ou adição de um (ou mais) aminoácido a partir de ou para a sequência (ou qualquer combinação dos mesmos), incluindo as variações alélicas, em comparação com a proteína de tipo selvagem, desde que a proteína resultante mantenha pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% da atividade imunogênica em comparação com as proteínas de tipo selvagem, como utilizadas na presente invenção. Tipicamente, as variantes dos polipeptídeos abrangidas pela presente invenção terão pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a SEQ. ID. NO. 2.

[0044] A identidade ou homologia de sequências pode ser determinada utilizando técnicas padrões conhecidas na técnica, tais como programa sequência Best Fit descrito por Devereux et al. Nucl. Acid Res. 12: 387-395 (1984) ou o programa BLASTX (Altschul et al., J Mol Biol 215, 403-410). O alinhamento pode incluir a introdução de gaps nas sequências a serem alinhadas. Além disso, para as sequências que contêm mais ou menos aminoácidos do que as proteínas aqui descritas compreende-se que a porcentagem de homologia será determinada com base no número de aminoácidos homólogos em relação ao número total de aminoácidos.

[0045] Em algumas modalidades, as variantes ou

derivados de polipeptídeos da presente invenção mantêm a hidrofobicidade/hidrofilicidade da sequência de aminoácidos. As substituições conservativas de aminoácidos podem ser feitas, por exemplo, a partir de 1, 2 ou 3 a 10, 20 ou 30 substituições, desde que a sequência modificada mantenha a capacidade de agir como um imunogene de acordo com a presente invenção. As substituições de aminoácidos podem incluir o uso de análogos que não ocorrem naturalmente, por exemplo, para aumentar a meia vida no plasma sanguíneo. As substituições conservadoras são conhecidas na técnica.

[0046] O termo "derivado", tal como usado aqui em relação à sequência de aminoácidos significa a modificação química de um polipeptídeo da invenção.

[0047] Exemplos não limitativos de tais modificações podem incluir, mas não estão limitados a, amidas ou ésteres alifáticos do terminal carboxil ou de resíduos contendo cadeias laterais de carboxil, derivados de O-acil de resíduos contendo grupos hidroxil e derivados de N-acil de resíduos contendo aminoácido do amino terminal ou do grupo amino, por exemplo, lisina ou arginina.

[0048] As modificações adicionais podem incluir, por exemplo, a produção de um polipeptídeo conjugado com polietileno glicol (PEG), ou a adição de PEG durante a síntese química de um polipeptídeo da invenção.

[0049] As modificações de polipeptídeos ou porções dos mesmos podem também incluir a redução/alquilação; acoplamento químico a um carreador apropriado ou tratamento em formalina suave.

[0050] O termo "modificado", tal como usado aqui se

refere à presença de uma modificação pós-traducional em um polipeptídeo. A forma termo "(modificado)" significa que os polipeptídeos em discussão são opcionalmente modificados, isto é, os polipeptídeos em discussão podem ser modificados ou não.

[0051] Os termos "pós-traducionalmente modificado" e "modificado" referem-se a qualquer modificação de um aminoácido natural ou não natural que ocorre para tal aminoácido depois de ter sido incorporado em uma cadeia de polipeptídeos. O termo engloba, por meio de exemplo apenas, as modificações cotraducionais *in vivo*, modificações pós-traducionais *in vivo* e modificações pós-traducionais *in vitro*.

[0052] Outros derivados dos polipeptídeos da presente invenção incluem a incorporação de resíduos de aminoácidos não naturais, ou resíduos de aminoácidos fosforilados, tais como resíduos de fosfotirosina, fosfoserina, ou fosfotreonina. Outras modificações possíveis incluem sulfonação, biotinilação, ou a adição de outras unidades, particularmente, as que possuem formas moleculares semelhantes aos grupos de fosfato.

[0053] Os derivados também incluem polipeptídeos modificados por glicosilação. Estes podem ser feitos modificando os padrões de glicosilação durante a síntese e processamento em vários sistemas de expressão em hospedeiros eucarióticos alternativos, ou durante etapas de processamento adicionais. Os Usos para produzir modificações de glicosilação incluem expor o polipeptídeo de p62 para glicosilar as enzimas derivadas de células que normalmente realizam esse processamento, tais como as

enzimas de glicosilação de mamífero. Alternativamente, as enzimas de desglicosilação podem ser usadas para remover os carboidratos fixos durante a produção em sistemas de expressão eucarióticos. Além disso, também se pode modificar a sequência de codificação para que o(s) sítio(s) de glicosilação seja(m) adicionado(s) ou sítios de glicosilação sejam excluídos ou desativados. Além disso, se não for desejada a glicosilação, as proteínas podem ser produzidas em um sistema de expressão em hospedeiros procarióticos.

[0054] As variantes e/ou derivados dos polipeptídeos da invenção podem ser preparados por síntese química ou através do uso de mutagênese sítio-dirigida (Gillman et al., *Gene*, 8:81 (1979); Roberts et al., *Nature* 328:731 (1987) ou Innis (Ed.), 1990, *PCR Protocols: a Guide to Methods e Applications*, Academic Press, Nova Iorque, NY, EUA) ou o Uso de reação em cadeia da polimerase (PCR; Saiki et al., *Science* 239:487 (1988)), como exemplificado por Daugherty et al. (*Nucleic Acids Res.* 19:2471 (1991)), para modificar os ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de p62 da invenção.

[0055] Em uma outra modalidade os polipeptídeos da presente invenção podem conter uma sequência sinal heteróloga na sua extremidade N-terminal. Em certas células hospedeiras (por exemplo, células hospedeiras de mamífero), expressão e/ou secreção da proteína de fusão pode ser aumentada através do uso de uma sequência sinal heteróloga. As sequências sinais são tipicamente caracterizadas por um núcleo de aminoácidos hidrofóbicos que são, geralmente, clivados da proteína madura durante a secreção em um ou

mais acontecimentos de clivagem. Tais peptídeos sinais contêm locais de processamento que permitem a clivagem da sequência sinal a partir das proteínas maduras à medida que passam pela via secretora. Assim, a invenção refere-se aos polipeptídeos descritos tendo uma sequência sinal, bem como a polipeptídeos a partir dos quais a sequência sinal foi clivada proteoliticamente (isto é, aos produtos de clivagem).

[0056] A fim de melhorar a estabilidade e/ou reatividade, os polipeptídeos da presente invenção podem também ser modificados para incorporar um ou mais polimorfismos na sequência de aminoácidos resultante de variação alélica natural. Adicionalmente, os D-aminoácidos, aminoácidos não naturais ou análogos de não aminoácidos podem ser substituídos ou adicionados para produzir um polipeptídeo de p62 modificado dentro do escopo da presente invenção.

[0057] Os polipeptídeos da presente invenção podem ser produzidos por expressão de uma sequência de nucleotídeos que codifica o mesmo em um sistema de expressão adequado.

[0058] Além disso, ou em alternativa, os polipeptídeos podem ser produzidos usando Usos químicos para sintetizar a sequência de aminoácidos desejada, no todo ou em parte. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser sintetizados por técnicas de fase sólida, clivados da resina, e purificados por cromatografia líquida preparativa de alto desempenho (por exemplo, Creighton (1983) Proteins Structures e Molecular Principles, WH Freeman e Co, Nova Iorque, NY). A composição dos polipeptídeos sintéticos pode ser confirmada por análise ou sequenciação de aminoácidos (por exemplo, o

procedimento de degradação de Edman). Além disso, a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo de p62, ou qualquer parte da mesma, pode ser alterada durante a síntese direta e/ou combinada usando Usos químicos com uma sequência de outras subunidades, ou qualquer parte das mesmas, para a produção de um polipeptídeo variante.

[0059] Os ensaios para medir a atividade imunológica de qualquer homólogo, derivado ou variante de quaisquer polipeptídeos da presente invenção são bem conhecidos na técnica.

[0060] Tal como usado aqui, o termo "proteínas de fusão" refere-se a proteínas quiméricas que compreendem sequências de aminoácidos de duas ou mais proteínas diferentes. Normalmente, as proteínas de fusão resultam de técnicas recombinatórias *in vitro* bem conhecidas na técnica.

[0061] Em modalidades adicionais, as proteínas de fusão da presente invenção podem compreender ainda um ou mais domínios polipeptídicos adicionais adicionados para facilitar a purificação da proteína, para aumentar a expressão da proteína recombinante, ou para aumentar a solubilidade da proteína recombinante. Tais domínios de facilitação da purificação/expressão/solubilidade incluem, mas não estão limitados a, peptídeos quelantes de metal, tais como módulos de histidina-triptofano que permitem a purificação em metais imobilizados (Porath J (1992) *Protein Expr Purif* 3-.26328 1), os domínios de proteína A que permitem a purificação sobre a imunoglobulina imobilizada, e o domínio utilizado no sistema de purificação de extensão/afinidade de FLAGS (Immunex Corp, Seattle, Wash.).

A inclusão de uma sequência de ligante clivável, tal como Fator Xa ou enterocinase (Invitrogen, San Diego, CA) entre o domínio de purificação e um polipeptídeo de p62 é útil para facilitar a purificação.

[0062] Os vetores de expressão de fusão adicionais incluem pGEX (Pharmacia, Piscataway, NJ), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) e pRITS (Pharmacia, Piscataway, NJ) que se fundem a glutathione S transferase (GST), proteína de ligação a maltose B, ou proteína A, respectivamente, com a proteína alvo recombinante. EBV, BKV, e outros vetores de expressão epissômicos (Invitrogen) também podem ser usados.

[0063] Em certas modalidades, é utilizado um polipeptídeo de p62 que codifica uma molécula de ácido nucleico. A molécula de ácido nucleico pode compreender ou consistir em uma sequência de nucleotídeos que codifica um ou mais polipeptídeos de p62, ou fragmentos (incluindo fragmentos que codificam os domínios em qualquer ordem ou polipeptídeos em que um ou mais domínios são eliminados ou interrompidos) ou derivados dos mesmos, tais como os contidos em uma inserção de DNA em um Depósito ATCC. O termo "sequência de ácidos nucleicos" ou "molécula de ácido nucleico" refere-se a uma sequência de DNA ou RNA. O termo abrange as moléculas formadas a partir de qualquer um dos análogos de bases conhecidas de DNA e RNA tais como, mas não limitados a, 4-acetilcitosina, 8-hidróxi-N6-metiladenosina, aziridinil-citosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracil, 5-carboxi-metilaminometiluracil, di-hidrouracil, inosina, N6-

iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracil, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracil, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracil, beta-D-manosilqueosina, 5' metoxicarbonil-metiluracil, 5-metóxiuracil, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, metil éster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxybutoxosina, pseudouracil, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracil, 2-tiouracil, 4-tiouracil, 5-metiluracil, metil éster de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracil, queosina, 2-tiocitosina e 2,6-diaminopurina, entre outros.

[0064] Em certas modalidades da presente invenção, os vetores são usados para transferir uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo para uma célula. Um vetor é uma molécula usada para transferir uma sequência de ácido nucleico para uma célula hospedeira. Em certos casos, é utilizado um vetor de expressão. Um vetor de expressão é uma molécula de ácido nucleico que é adequada para a introdução e/ou a propagação em uma célula hospedeira e contém sequências de ácidos nucleicos que dirigem e/ou controlam a expressão das sequências de ácidos nucleicos transferidos. A expressão inclui, mas não está limitada a, processos tais como a transcrição, a tradução, e splicing, se os íntrons estiverem presentes. Os vetores de expressão tipicamente compreendem uma ou mais sequências de flanqueamento operacionalmente ligadas a uma sequência de ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo. Sequências de flanqueamento podem ser homólogas (isto é,

das mesmas espécies e/ou cepas que a célula hospedeira), heterólogas (isto é, a partir de espécies diferentes das cepas ou espécies da célula hospedeira), híbridas (isto é, uma combinação de sequências de flanqueamento de mais do que uma fonte), ou sintéticas, por exemplo.

[0065] A sequência de flanqueamento é, de preferência, capaz de efetuar a replicação, transcrição e/ou tradução da sequência de codificação e está operacionalmente ligada a uma sequência de codificação. Tal como usado aqui, o termo operacionalmente ligado refere-se a uma ligação de elementos polinucleotídicos em uma relação funcional. Por exemplo, um promotor ou um potencializador está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se o mesmo afeta a transcrição da sequência de codificação. No entanto, uma sequência de flanqueamento não tem necessariamente de ser contígua à sequência de codificação, desde que funcione corretamente. Assim, por exemplo, as sequências transcritas já não traduzidas intervenientes podem estar presentes entre uma sequência promotora e a sequência de codificação e a sequência promotora pode ainda ser considerada operacionalmente ligada à sequência de codificação. De igual modo, uma sequência potencializadora pode ser localizada a montante ou a jusante da sequência de codificação e afetar a transcrição da sequência.

[0066] Em certas modalidades, é preferido que a sequência de flanqueamento esteja em uma região reguladora da transcrição que aciona a expressão de genes de alto nível na célula alvo. A região reguladora transcricional pode compreender, por exemplo, um promotor, potencializador, silenciador, elemento repressor, ou

combinações dos mesmos. A região reguladora transcricional pode ser quer constitutiva, específica de tecidos, específica do tipo de célula (isto é, a região é acionada de níveis mais elevados de transcrição de um tipo de tecido ou célula, em comparação com outro), ou regulável (isto é, responsivo à interação com uma molécula). A fonte de uma região reguladora da transcrição pode ser qualquer organismo procariótico ou eucariótico, qualquer organismo vertebrado ou invertebrado, ou qualquer planta, desde que a sequência de flanqueamento funcione em uma célula, causando a transcrição de um ácido nucleico dentro da célula. Uma ampla variedade de regiões reguladoras da transcrição pode ser utilizada na prática da presente invenção.

[0067] As regiões reguladoras de transcrição adequadas incluem, por exemplo, o promotor de CMV (isto é, o promotor de CMV precoce imediato); promotores de genes eucarióticos (por exemplo, o gene da ovalbumina de galinha induzível por estrogênios, os genes do interferon, o gene de tirosina aminotransferase induzível por glicocorticóides, e o gene da timidina quinase); e os principais promotores dos genes de adenovírus precoces e tardios; região promotora precoce de SV40 (Bernoist e Chambon, 1981, Nature 290:304-10); o promotor contido na repetição terminal 3' de comprimento (LTR) do vírus do sarcoma de Rous (RSV) (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-97.); o promotor de timidina cinase do vírus do herpes simplex (HSV-TK) (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 78:1444-45); as sequências reguladoras do gene da metalotionina (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); vetores de expressão procarióticos tais como o promotor da beta-lactamase (VIIIa-Kamaroff et

al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 75:3727-31), ou o promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 80:21-25). As regiões de controle de transcrição específicas do tipo de célula e/ou de tecido incluem, por exemplo, a região de controle do gene da elastase I que é ativa em células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-46; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); região de controle do gene da insulina que é ativo em células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22); região de controle do gene da imunoglobulina que é ativo em células linfóides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-58; Adames et al., 1985, Nature 318:533-38; Alexander et al., 1987, Mol Cell Biol, 7:1436-44); a região de controle do vírus do tumor mamário de camundongo em células testiculares, da mama, linfóides e mastócitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-95); a região de controle do gene da albumina, no fígado (Pinkert et al., 1987, Genes e Devel. 1:268-76.); a região de controle do gene da alfa-feto-proteína no fígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); a região de controle do gene da alfa 1-antitripsina no fígado (Kelsey et al., 1987, Genes e Devel. 1:161-71); região de controle do gene da beta-globina em células mielóides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-40; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); região de controle do gene da proteína básica da mielina em células de oligodendrócitos no cérebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-12.), a região de controle do gene 2 da miosina de cadeia leve no músculo esquelético (Sani, 1985, Nature

314:283-86), a região de controle do gene do hormônio de liberação gonadotrópico no hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-78), e o promotor da tirosinase em células de melanoma (Hart, I. Semin Oncol 1996 fevereiro; 23(1):154-8; Siders, et al. Cancer Gene Ther 1998 set-out; 5(5):281-91), entre outros. Os promotores induzíveis que são ativados na presença de certa molécula ou condição tal como, luz, calor, radiação, tetraciclina, ou proteínas de choque térmico, por exemplo, podem também ser utilizados (ver, por exemplo, WO 00/10612). Outros promotores apropriados são conhecidos na técnica.

[0068] Como descrito acima, os potencializadores podem também ser sequências de flanqueamento adequadas. Os potencializadores são elementos cis-atuantes de DNA, normalmente de cerca de 10-300 pb de comprimento, que atuam no promotor para aumentar a transcrição. Os potencializadores são, normalmente, independentes da orientação e da posição, tendo sido identificados ambos 5' e 3' para as sequências de codificação controladas. Várias sequências potencializadoras disponíveis a partir de genes de mamíferos são conhecidas (isto é, globina, elastase, albumina, alfa-feto-proteína e insulina). Do mesmo modo, o potencializador de SV40, o potencializador do promotor precoce de citomegalovírus, o potencializador de polioma e potencializadores de adenovírus são úteis com sequências promotoras eucarióticas. Embora um potencializador possa ser unido no vetor em uma posição a 5' ou 3' ao ácido nucleico que codifica a sequência, o mesmo normalmente está localizado em um sítio 5' do promotor. Outros potencializadores adequados são conhecidos na técnica, e

serão aplicáveis na presente invenção.

[0069] Em certas modalidades, pode ser vantajoso combinar um polipeptídeo de p62, ou sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de p62, ou um derivado do mesmo com um ou mais componentes coestimulador(es), tais como as proteínas da superfície celular, citocinas, quimiocinas, ou moléculas de sinalização em uma composição da presente invenção. O componente coestimulador pode ser incluído na composição, como um polipeptídeo ou um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo, por exemplo. Moléculas coestimuladoras adequadas incluem, por exemplo, polipeptídeos que se ligam a membros da família de CD28 (isto é, CD28, ICOS; Hutloff, et al. *Nature* 1999, 397: 263-265; Peach, et al. *J Exp Med* 1994, 180: 2049-2058), tais como polipeptídeos B7.1 de ligação a CD28 (CD80; Schwartz, 1992; Chen et al, 1992; Ellis, et al. *J. Immunol.*, 156(8): 2700-9) e B7.2 (CD86; Ellis, et al. *J. Immunol.*, 156(8): 2700-9); polipeptídeos que se ligam a membros da família das integrinas (isto é, LFA-1 (CD11a/CD18); Sedwick, et al. *J Immunol* 1999, 162: 1367-1375; Wulfing, et al. *Science* 1998, 282: 2266-2269; Lub, et al. *Immunol Today* 1995, 16: 479-483), incluindo os membros da família MAIC (ou seja, ICAM-1, -2 ou -3); polipeptídeos que se ligam a membros da família de CD2 (isto é, CD2, sinalização de molécula de ativação de linfócitos (CDw150 or "SLAM"; Aversa, et al. *J Immunol* 1997, 158: 4036-4044)) tal como CD58 (LFA-3; ligante de CD2; Davis, et al. *Immunol Today* 1996, 17: 177-187) ou ligantes de SLAM (Sayos, et al. *Nature* 1998, 395: 462-469); polipeptídeos que se ligam a antígenos estáveis ao calor

(HSA or CD24; Zhou, et al. Eur J Immunol 1997, 27: 2524-2528); polipeptídeos que se ligam a membros da família do do receptor de TNF (TNFR)(ou seja, 4-1BB (CD137; Vinay, et al. Semin Immunol 1998, 10: 481-489), OX40 (CD134; Weinberg, et al. Semin Immunol 1998, 10: 471-480; Higgins, et al. J Immunol 1999, 162: 486-493), e CD27 (Lens, et al. Semin Immunol 1998, 10: 491-499)) tais como 4-1BBL (ligante 4-1BB; Vinay, et al. Semin Immunol 1998, 10: 481-48; DeBenedette, et al. J Immunol 1997, 158: 551-559), fator-1 associado a TNFR (TRAF-1; ligante 4-1BB; Saoulli, et al. J Exp Med 1998, 187: 1849-1862, Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558-565), TRAF-2 (ligantes 4-1BB e OX40; Saoulli, et al. J Exp Med 1998, 187: 1849-1862; Oshima, et al. Int Immunol 1998, 10: 517-526, Kawamata, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808-5814), TRAF-3 (ligantes 4-1BB e OX40; Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558-565; Jang, et al. Biochem Biophys Res Commun 1998, 242: 613-620; Kawamata S, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808-5814), OX40L (ligante OX40; Gramaglia, et al. J Immunol 1998, 161: 6510-6517), TRAF-5 (ligante OX40; Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558-565; Kawamata, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808-5814), e CD70 (CD27, ligante; Couderc, et al. Cancer Gene Ther., 5(3): 163-75). O CD154 (ligante CD40 ou "CD40L"; Gurunathan, et al. J. Immunol., 1998, 161: 4563-4571; Sine, et al. Hum. Gene Ther., 2001, 12: 1091-1102) pode também ser adequado.

[0070] Uma ou mais citocinas podem também ser componentes coestimuladores adequados ou "adjuvantes", quer como polipeptídeos ou sendo codificados por ácidos nucleicos contidos dentro das composições da presente

invenção (Parmiani, et al. Immunol Lett 2000 Sep. 15; 74(1): 41-4; Berzofsky, et al. Nature Immunol. 1: 209-219). Citocinas adequadas incluem, por exemplo, a interleucina-2 (IL-2) (Rosenberg, et al. Nature Med. 4: 321-327 (1998)), IL-4, IL-7, IL-12 (revisto por Pardoll, 1992; Harries, et al. J. Gene Med. 2000 Jul-Ago; 2(4):243-9; Rao, et al. J. Immunol. 156: 3357-3365 (1996)), IL-15 (Xin, et al. Vaccine, 17:858-866, 1999), IL-16 (Cruikshank, et al. J. Leuk Biol. 67(6): 757-66, 2000), IL-18 (J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2001. 127(12): 718-726), GM-CSF (CSF (Disis, et al. Blood, 88: 202-210 (1996)), fator-alfa de necrose tumoral (TNF-alfa), ou interferons, tais como IFN-alfa ou IFN-gama. Outras citocinas podem também ser adequadas para a prática da presente invenção, tal como é conhecido na técnica.

[0071] As quimiocinas também podem ser utilizadas. Por exemplo, proteínas de fusão compreendendo CXCL10 (IP-10) e CCL7 (MCP-3) fundidas com um autoantígeno de tumor têm mostrado induzir a imunidade antitumor (Biragyn, et al. Nature Biotech. 1999, 17: 253-258). As quimiocinas CCL3 (MIP-1.alfa.) e CCL5 (RANTES) (Boyer, et al. Vaccine, 1999, 17 (Supp. 2): S53-S64) também podem ser usadas na prática da presente invenção. Outras quimiocinas adequadas são conhecidas na técnica.

[0072] Uma "molécula de sinalização" é um composto químico biológico envolvido na transmissão de informação entre as células. Estas moléculas são liberadas a partir da célula que enviam o sinal, atravessam a lacuna entre as células por difusão, e interagem com os receptores específicos na outra célula, desencadeando uma resposta na

célula através da ativação de uma série de reações enzimáticas controladas que conduzem a alterações no interior da célula. Por exemplo, sulfeto de hidrogênio é produzido em pequenas quantidades por algumas células do corpo humano e tem uma série de funções de sinalização biológica. Apenas os exemplos incluem óxido nítrico e monóxido de carbono.

[0073] É também conhecido na técnica que os mecanismos imunes supressivos ou reguladores negativos podem ser bloqueados, resultando em respostas imunes melhoradas. Por exemplo, o tratamento com anticorpo anti-CTLA-4 (Shrikant, et al. *Immunity*, 1996, 14: 145-155; Suttmuller, et al. *J. Exp. Med.*, 2001, 194: 823-832), anticorpos anti-CD25 (Suttmuller, supra), anticorpo anti-CD4 (Matsui, et al. *J. Immunol.*, 1999, 163: 184-193), a proteína de fusão IL13Ra2-Fc (Terabe, et al. *Nature Immunol.*, 2000, 1: 515-520), e as combinações dos mesmos (isto é, anticorpos anti-CD25 e anti-CTLA-4, Suttmuller, supra) demonstraram regular positivamente as respostas imunes antitumorais e seriam adequados na prática da presente invenção.

[0074] Qualquer um destes componentes pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes. Por exemplo, demonstrou-se que uma combinação de CD80, ICAM-1 e LFA-3 ("TRICOM") pode potencializar respostas imunes anti-câncer (Hodge, et al. *Cancer Res.* 59: 5800-5807 (1999)). Outras combinações eficazes incluem, por exemplo, IL-12+GM-CSF (Ahlers, et al. *J. Immunol.*, 158: 3947-3958 (1997); Iwasaki, et al. *J. Immunol.* 158: 4591-4601 (1997)), IL-12+GM-CSF+TNF- α . (Ahlers, et al. *Int. Immunol.* 13: 897-908 (2001)), CD80+IL-12 (Fruend, et al. *Int. J. Cancer*, 85:

508-517 (2000); Rao, et al. supra), e CD86+GM-CSF+IL-12 (Iwasaki, supra). Um versado na técnica estaria ciente de combinações adicionais úteis na realização da presente invenção. Além disso, o versado na técnica estaria ciente dos reagentes ou de outros Usos que podem ser utilizados para modular tais mecanismos. Estes reagentes e Usos, bem como outros conhecidos pelos versados na técnica, podem ser utilizados na prática da presente invenção.

[0075] Estratégias adicionais para aprimorar a eficiência de imunização à base de ácido nucleico podem também ser usadas incluindo, por exemplo, o uso de replicons virais autorreplicantes ((Caley, et al. 1999. *Vaccine*, 17: 3124-2135; Dubensky, et al. 2000. *Mol. Med.* 6: 723-732; Leitner, et al. 2000. *Cancer Res.* 60: 51-55), a códon otimização (Liu, et al. 2000. *Mol. Ther.*, 1: 497-500; Dubensky, supra; Huang, et al. 2001. *J. Virol.* 75: 4947-4951), electroporação in vivo (Widera, et al. 2000. *J. Immunol.* 164: 4635-3640), incorporação de motivos estimuladores de CpG (Gurunathan, et al. *Ann. Rev. Immunol.*, 2000, 18: 927-974; Leitner, supra; Cho, et al. *J. Immunol.* 168(10):4907-13). Sequências para direcionamento das vias endocíticas ou de processamento de ubiquitina (Thomson, et al. 1998. *J. Virol.* 72: 2246-2252; Velders, et al. 2001. *J. Immunol.* 166: 5366-5373), sequências VP22 tipo 1 de vírus da doença de Marek (*J. Virol.* 76(6):2676-82, 2002), os regimes de reforço de iniciador (Gurunathan, supra; Sullivan, et al. 2000. *Nature*, 408: 605-609; Hanke, et al. 1998. *Vaccine*, 16: 439-445; Amara, et al. 2001. *Science*, 292: 69-74), e o uso de vetores de distribuição da mucosa, tais como *Salmonella* (Darji, et al. 1997. *Cell*, 91:

765-775; Woo, et al. 2001. Vaccine, 19: 2945-2954). Outros Usos são conhecidos na técnica, alguns dos quais são descritos abaixo.

[0076] Os agentes quimioterapêuticos, radiação, moléculas antiangiogênicas, ou outros agentes podem ser também utilizados no tratamento e/ou prevenção do câncer utilizando polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 (Sebti, et al. Oncogene 2000 Dec. 27; 19(56):6566-73). Por exemplo, no tratamento do câncer da mama metastático, os agentes quimioterapêuticos úteis incluem a ciclofosfamida, doxorrubicina, paclitaxel, docetaxel, navelbina, capecitabina e mitomicina C, entre outros. Os regimes de quimioterapia de combinação também têm se mostrado eficazes, incluindo ciclofosfamida + metotrexato + 5-fluorouracil; ciclofosfamida + doxorrubicina + 5-fluorouracil; ou, ciclofosfamida + doxorrubicina, por exemplo. Outros compostos tais como prednisona, um taxano, navelbina, mitomicina C ou vinblastina foram utilizados por várias razões. A maioria dos pacientes com câncer de mama têm tumores positivos para receptor de estrogênio (ER+) e, nestes pacientes, a terapia endócrina (ou seja, o tamoxifeno) é preferível à quimioterapia. Para esses pacientes, o tamoxifeno ou, como uma terapia de segunda linha, a progesterona (acetato de medroxiprogesterona ou acetato de megestrol) são os preferidos. Os inibidores de aromatase (por exemplo, aminoglutetimida e análogos dos mesmos, tais como letrozol) diminuem a disponibilidade do estrogênio necessária para manter o crescimento tumoral e podem ser utilizados como terapia de segunda ou terceira linha em certos pacientes

endócrinos.

[0077] Outros tipos de câncer podem exigir diferentes regimes de quimioterapia. Por exemplo, o câncer colorretal metastático é tipicamente tratado com Camptosar (irinotecano ou CPT-11), 5-fluorouracil ou leucovorina, sozinhos ou em combinação um com o outro. Os inibidores de proteases e integrina, como marimastato inibidores de MMP (Biotech British), COL-3 (Collagenex), Neovastat (Aeterna), AG3340 (Agouron), BMS-275.291 (Bristol Myers Squibb), CGS 27023A (Novartis) ou os inibidores da integrina Vitaxina (Medimmune), ou MED1522 (Merck KgaA) podem também ser adequados para uso. Como tal, o alvo imunológico de alvos imunogênicos associados a câncer colorretal pode ser realizado em combinação com um tratamento utilizando esses agentes quimioterapêuticos. Do mesmo modo, os agentes quimioterapêuticos utilizados para tratar outros tipos de cânceres são bem conhecidas na técnica e podem ser combinados com os alvos imunogênicos aqui descritos.

[0078] Muitos agentes antiangiogênicos são conhecidos na técnica e seriam adequados para coadministração com vacinas de polipeptídeo ou ácido nucleico de p62 (ver, Timar, et al. 2001. Pathology Oncol. Res., 7(2): 85-94). Tais agentes incluem, por exemplo, agentes fisiológicos tais como fatores de crescimento (isto é, ANG-2, NK1, 2, 4 (HGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β)), citocinas (isto é, interferons, tais como IFN- α , - β , - γ , fator plaquetário 4 (PF-4), PR-39), proteases (ou seja, AT-III clivada, fragmento XVIII de colágeno (Endostatina)), fragmento da plasmina HmwKallikrein-d5 (Angiostatina), protrombina-F1-2, TSP-1), inibidores de protease (isto é,

inibidor tecidual de metaloproteases, tal como TIMP-1,-2, ou-3; maspina; ativadores-inibidores de plasminogênio tais como PAI-1; fator derivado do epitélio de pigmento (PEDF)), Tumstatina (disponível através ILEX, Inc.), produtos de anticorpos (isto é, os anticorpos de ligação ao colágeno HUIV26, HUI77, XL313; anti-VEGF, anti-integrina (isto é, Vitaxina, (Lxsys))), e as glicosidases (isto é, heparinase-I, III). Moléculas que são antagonistas de antígenos associados a angiogênese (incluindo proteínas e polipeptídeos) são também adequadas e podem incluir, mas não estão limitadas a, moléculas dirigidas contra VEGF, receptor de VEGF, EGFR, bFGF, PDGF-B, PD-ECGF, TGFs incluindo TGF-.alfa, endoglina, proteínas Id, várias proteases, óxido nítrico sintase, aminopeptidase, tromboespondinas, k-ras, Wnt, quinases dependentes de ciclina, microtúbulos, proteínas de choque térmico, fatores de ligação à heparina, sintases, receptores de colágeno, integrinas e proteoglicanos de superfície NG2. "Química" ou agentes fisiológicos modificados conhecidos ou que se acredita terem potencial antiangiogênico incluem, por exemplo, vinblastina, taxol, cetoconazol, talidomida, dolestatina, combrestatina A, rapamicina (Guba, et al 2002, Nature Med, 8: 128-135), CEP-7055 (disponível junto à Cephalon, Inc.), ácido acético de flavona, Bay 12-9566 (Bayer Corp), AG3340 (Agouron, Inc.), CGS. 27023A (Novartis), derivados de tetracycline (isto é, COL-3 (Collagenix, Inc.)), Neovastat (Aeterna), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), uma dose baixa de 5-FU, dose baixa de metotrexato (MTX), irsofladina, radicicol, ciclosporina, captopril, celecoxib, polissacárido sulfatado-D45152,

proteína catiônica (Protamine), peptídeo catiônico-VEGF, suramina (naftil ureia polissulfonada), compostos que interferem com a função ou a produção de VEGF (por exemplo, SU5416 ou SU6668 (Sugen), PTK787/ZK22584 (Novartis)), Distamicina A, Angiozima (ribozima), isoflavinóides, derivados de estaurosporina, genisteína, EMD121974 (Merck KcgaA), tirfostinas, isoquinolonas, ácido retinóico, carboxiamidotriazol, TNP-470, octreotida, 2-metoxiestradiol, aminoesteróis (isto é, a esqualamina), análogos de glutathione (ou seja, N-acteil-L-cisteína), combretastatina A-4 (Oxigene), agentes bloqueadores de receptor Eph (Nature, 414:933-938, 2001), Rh-angiostatina, Rh-endostatina (WO 01/93897), peptídeo RGD cíclico, acutina-desintegrina, benzodiazepenas, anti-avb3 humanizado Ab, Rh-PAI-2, amilorida, p-amidobenzamidina, anti-uPA ab, anti-uPAR Ab, L-fenilalanina-N-metilamidas (isto é, Batimistat, Marimastat), AG3340 e minociclina. Muitos outros agentes adequados são conhecidos na técnica e seriam suficientes na prática da presente invenção.

[0079] A presente invenção também pode ser utilizada em combinação com Usos "não tradicionais" para o tratamento de câncer. Por exemplo, foi demonstrado que a administração de certas bactérias anaeróbicas pode ajudar no retardamento do crescimento do tumor. Em um estudo, *Clostridium novyi* foi modificado para eliminar um gene de toxina transportado em um epissoma de fago e administrado a camundongos com tumores colorrectais (Dang, et al. P.N.A.S. USA, 98(26): 15155-15160, 2001). Em combinação com a quimioterapia, o tratamento mostrou provocar necrose tumoral nos animais. Os reagentes e as metodologias descritas no presente pedido

podem ser combinados com tais metodologias de tratamento.

[0080] Os ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de p62 podem ser administrados aos pacientes por qualquer uma das várias técnicas disponíveis. Vários vetores virais que têm sido utilizados com sucesso para a introdução de um ácido nucleico a um hospedeiro incluem retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociado (AAV), vírus do herpes, e poxvírus, entre outros. É entendido na técnica que muitos desses vetores virais estão disponíveis na técnica. Os vetores da presente invenção podem ser construídos utilizando técnicas padrões recombinantes amplamente disponíveis para um versado na técnica. Tais técnicas podem ser encontradas em referências comuns de biologia molecular, tais como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology* (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.), e *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.).

[0081] Os vetores retrovirais adequados incluem derivados de lentivírus, bem como os derivados de retrovírus de murino ou aves. Exemplos de vetores retrovirais adequados incluem, por exemplo, o vírus da leucemia de murino de Moloney (MoMuLV), vírus do sarcoma de murino de Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário de murino (MuMTV), SIV, BIV, HIV e vírus do Sarcoma de Rous (RSV). Uma série de vetores retrovirais pode incorporar múltiplas sequências de ácidos nucleicos exógenos. Embora os retrovírus recombinantes sejam defeituosos, eles necessitam

de ajuda para produzir partículas infecciosas de vetor. Esta assistência pode ser fornecida, por exemplo, linhagens de células helper que codificam genes estruturais de retrovirus. As linhagens de células helper adequadas incluem PSI.2, PA317 e PA12, entre outras. Os viriões de vetores produzidos utilizando tais linhagens de células podem então ser utilizados para infectar uma linhagem de células de tecidos, tais como células NIH 3T3, para produzir grandes quantidades de viriões retrovirais quiméricos. Os vetores retrovirais podem ser administrados através de Usos tradicionais (isto é, injeção) ou por implante de uma "linhagem de células produtora" em proximidade com a população de células alvos ((Culver, K., et al., 1994, *Hum. Gene Ther.*, 5 (3): 343-79; Culver, K., et al., *Cold Spring Harb. Symp; Quant. Biol.*, 59: 685-90); Oldfield, E., 1993, *Hum. Gene Ther.*, 4 (1): 39-69). A linhagem de células produtora foi manipulada para produzir um vetor viral e liberar as partículas virais na vizinhança da célula alvo. Uma porção das partículas virais liberadas contata as células alvos e infeta essas células, fornecendo assim um ácido nucleico da presente invenção para a célula alvo. Após a infecção das células alvos, a expressão do ácido nucleico do vetor ocorre.

[0082] Os vetores adenovirais provaram ser especialmente úteis para a transferência de genes em células eucarióticas (Rosenfeld, M., et al., 1991, *Science*, 252 (5004): 431-4; Crystal, R., et al., 1994, *Nat. Genet.*, 8 (1): 42-51), o estudo expressão de genes eucarióticos (Levrero, M., et al., 1991, *Gene*, 101 (2): 195-202), o desenvolvimento de vacinas (Graham, F. and Prevec, L.,

1992, *Biotechnology*, 20: 363-90), e em modelos animais (Stratford-Perricaudet, L., et al., 1992, *Bone Marrow Transplant.*, 9 (Suppl. 1): 151-2; Rich, D., et al., 1993 *Hum. Gene Ther.*, 4 (4): 461-76). Vias experimentais para a administração do adenovírus recombinante para diferentes tecidos *in vivo* têm incluído a instilação intratraqueal (Rosenfeld, M., et al., 1992, *Cell*, 68 (1): 143-55) injeção no músculo (Quantin, B., et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89 (7): 2581-4), injeção intravenosa periférica (Herz, J., and Gerard, R., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 (7): 2812-6) e inoculação estereotáxica de cérebro (Le Gal La Salle, G., et al., 1993, *Science*, 259 (5097): 988-90), entre outros.

[0083] O vírus adenoassociado (AAV) demonstra a infectividade de alto nível, amplo espectro de hospedeiros e especificidade na integração no genoma da célula hospedeira (Hermonat, P., et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (20): 6466-70). E o vírus Herpes Simplex do tipo 1 (HSV-1) é ainda outro sistema de vetor atrativo, especialmente para uso no sistema nervoso devido a sua propriedade neurotrópica (Geller, A., et al., 1991, *Trends Neurosci.*, 14 (10): 428-32; Glorioso, et al., 1995, *Mol. Biotechnol.*, 4 (1): 87-99; Glorioso, et al., 1995, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 675-710).

[0084] O poxvírus é outro vetor de expressão útil (Smith, et al. 1983, *Gene*, 25 (1): 21-8; Moss, et al, 1992, *Biotechnology*, 20: 345-62; Moss, et al, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 25-38; Moss, et al. 1991. *Science*, 252: 1662-1667). Os poxvírus mostrados serem úteis incluem vaccinia, NYVAC, avipox, fowlpox, canarypox, ALVAC,

e ALVAC(2), entre outros.

[0085] NYVAC (vP866) foi derivado da cepa de vacina Copenhagen do vírus vaccinia por exclusão de seis regiões não essenciais do genoma que codificam fatores de virulência conhecidos ou potenciais (ver, por exemplo, Patentes U.S. N°s 5.364.773 e 5.494.807). Os loci de deleção foram também manipulados como loci receptor para a inserção de genes estranhos. As regiões deletadas são: gene da timidina cinase (TK: J2R); região hemorrágica (u; B13R+B14R); a região tipo corpo de inclusão (ATI; A26L); gene de hemaglutinina (HA; A56R); região do gene de alcance de hospedeiros (C7L-K1L); e, subunidade grande, ribonucleotídeo redutase (I4L). NYVAC é uma cepa de vírus da vaccinia geneticamente manipulada que foi gerada pela deleção específica de dezoito estruturas de leitura aberta que codificam produtos de genes associados com a faixa de virulência e de hospedeiro. NYVAC mostrou ser útil para expressar TAs (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 6.265.189). NYVAC (vP866), vP994, vCP205, vCP1433, placZH6H4Lreverse, pMPC6H6K3E3 e pC3H6FHVB também foram depositados na ATCC sob os termos do Tratado de Budapeste, números de acesso VR-2559, VR-2558, VR-2557, VR-2556, ATCC-97913, ATCC-97912 e ATCC-97914, respectivamente.

[0086] Os vírus recombinantes baseados em ALVAC (isto é, ALVAC-1 e ALVAC-2) também são adequados para uso na prática da presente invenção (ver, por exemplo, Patente U.S. N° 5.756.103). ALVAC (2) é idêntico a ALVAC (1), exceto que ALVAC (2) compreende os genes E3L e K3L de vaccinia sob o controle de promotores de vaccinia (Patente U.S. N° 6.130.066. Beattie et al., 1995a, 1995b, 1991;

Chang et al., 1992; Davies et al., 1993). Ambos ALVAC (1) e ALVAC (2) demonstraram ser úteis na expressão de sequências de DNA estranho, tais como TAs (Tartaglia et al., 1993 a, b; Patente U.S. Nº. 5.833.975). ALVAC foi depositado sob os termos do Tratado de Budapeste com a American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virgínia 20110-2209, EUA, número de acesso ATCC VR-2547.

[0087] Um outro vetor de poxvírus útil é TROVAC. TROVAC refere-se a um fowlpox atenuado que foi um isolado clonado em placa derivado da cepa de vacina de FP-1 de vírus fowlpox que está licenciado para vacinação de pintos de 1 dia de idade. TROVAC foi igualmente depositado sob os termos do Tratado de Budapeste com o ATCC, número de acesso 2553.

[0088] Os vetores de plasmídeo "não virais" podem também ser adequados na prática da presente invenção. Os vetores de plasmídeo adequados são compatíveis com células hospedeiras de bactérias, insetos e/ou de mamíferos. Tais vetores incluem, por exemplo, PCR-II, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene, La Jolla, Calif.), pET15 (Novagen, Madison, Wis.), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT pub. No. WO 90/14363) e pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, N.Y.), bem como derivados do plasmídeo Bluescript.RTM. (um fagomídeo baseado em COLE1 de número de cópias elevado, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Califórnia), plasmídeos de clonagem de PCR projetados para a clonagem de produtos de PCR amplificados de Taq (por exemplo, kit TOPO.TM. TA Cloning.RTM., derivados de

plasmídeo PCR2.1.RTM..RTM., Invitrogen, Carlsbad, Califórnia). Vetores bacterianos também podem ser usados com a presente invenção. Estes vetores incluem, por exemplo, Shigella, Salmonella, Vibrio cholerae, Lactobacillus, Bacilo de Calmette Guerin (BCG) e Streptococcus (ver, por exemplo, WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796; e WO 92/21376). Muitos outros vetores e sistemas de expressão de plasmídeo não virais são conhecidos na técnica e podem ser utilizados com a presente invenção.

[0089] As técnicas de distribuição de ácidos nucleicos adequadas incluem complexos de ligação de DNA, complexos de DNA de ligação de adenovírus, injeção direta de DNA, precipitação de CaPO_4 , técnicas de arma de genes, eletroporação e sistemas de dispersão coloidal, entre outros. Os sistemas de dispersão coloidal incluem complexos de macromoléculas, nanocápsulas, microsferas, esferas e sistemas de base lipídica, incluindo emulsões de óleo em água, micelas, micelas mistas e lipossomas. O sistema coloidal preferido desta invenção é um lipossoma, que são vesículas membranares artificiais úteis como veículos de distribuição *in vitro* e *in vivo*. RNA, DNA e viriões intactos podem ser encapsulados no interior aquoso e ser distribuídos às células em uma forma biologicamente ativa (Fraley, R., et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 77). A composição do lipossoma é normalmente uma combinação de fosfolipídeos, particularmente, fosfolipídeos de elevada fase de transição de temperatura, normalmente em combinação com esteróides, especialmente colesterol. Outros fosfolipídeos ou outros lipídeos também podem ser

utilizados. As características físicas dos lipossomas dependem do pH, força iônica e da presença de cátions divalentes. Exemplos de lipídeos úteis na produção de lipossomas incluem compostos de fosfatidil, tais como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolipídeos, cerebrosídeos e gangliosídeos. Particularmente úteis são os diacilfosfatidilgliceróis, onde a porção de lipídeo contém 14-18 átomos de carbono, particularmente, 16-18 átomos de carbono, e é saturada. Fosfolipídeos ilustrativos incluem fosfatidilcolina do ovo, dipalmitoilfosfatidilcolina e diestearoilfosfatidilcolina.

[0090] Um alvo imunogênico pode também ser administrado em combinação com um ou mais adjuvantes para aumentar a resposta imune. Exemplos de adjuvantes são mostrados na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Tipos de Adjuvantes Imunológicos

Tipo de Adjuvante	Exemplos gerais	Exemplos específicos/Referências
Tipo de gel	Hidróxido de alumínio/fosfato	(Aggerbeck e Heron, 1995)
	("adjuvantes de alum")	
	Fosfato de cálcio	(Relyveld, 1986)
Micróbio	Muramil dipeptídeo (MDP)	(Chedid et al., 1986)

	Exotoxinas Bacterianas	Cholera toxin (CT), E. coli labile toxin (LT) (Freytag e Clements, 1999)
	Adjuvantes baseados em endotoxina	Monofosforil lipídeo A (MPL) (Ulrich e Myers, 1995)
	Outras bactérias	Oligonucleotídeos CpG (Corral e Petray, 2000), sequências BCG (Krieg, et al. Nature, 374: 576), tetanus toxoid (Rice, et al. J. Immunol., 2001, 167: 1558-1565)
Particulado	Biodegradável	(Gupta et al., 1998)
	Microesferas de polímero	
	Complexes Imunoestimuladores (ISCOMs)	(Morein e Bengtsson, 1999)
	Lipossomas	(Wassef et al., 1994)
Emulsão de óleo e adjuvantes à base de surfactante	Adjuvante incompleto de Freund	(Jensen et al., 1998)
	Emulsões Microfluidizadas	MF59 (Ott et al., 1995)

		SAF (Allison e Byars, 1992) (Allison, 1999)
	Saponinas	QS-21 (Kensil, 1996)
Sintético	Derivados de muramil peptídeo	Murabutide (Lederer, 1986), Threony-MDP (Allison, 1997)
	Copolímeros de bloco Não iônicos	L121 (Allison, 1999)
	Polifosfazeno (PCPP)	(Payne et al., 1995)
	Polinucleotídeos sintéticos	Poly A: U, Poly I: C (Johnson, 1994)
	Derivados de Talidomida	CC-4047/ACTIMID (J. Immunol., 168(10): 4914-9)

[0091] Em algumas modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos de codificação de p62 de acordo com a presente invenção podem ser usados para tratar, aliviar, melhorar, atenuar, retardar o início de (profilaxia), inibir a progressão de, reduzir a gravidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas ou características de uma doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos de codificação de p62 podem ser utilizados para tratar tumores sólidos, por exemplo, o câncer e/ou células de câncer. O termo "câncer" inclui os cânceres malignos, bem como pré-malignos. Cânceres incluem, mas não estão limitados a, o câncer de próstata, câncer de estômago, câncer colorretal, câncer de pele, por exemplo, melanomas

ou carcinomas basocelulares, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de útero, câncer de cabeça e pescoço, câncer de brônquios, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer do cérebro ou do sistema nervoso central, câncer do sistema nervoso periférico, câncer de esôfago, câncer da cavidade oral ou faringe, câncer de fígado, câncer de rim, câncer testicular, câncer do trato biliar, câncer de intestino delgado ou de apêndice, câncer da glândula salivar, câncer de tireóide, câncer da glândula adrenal, osteossarcoma, condrossarcoma, sarcoma, câncer de tecidos hematológicos, e semelhantes. As "células de câncer" podem estar na forma de um tumor, existir somente dentro de um sujeito (por exemplo, células de leucemia ou ascite), ou seja, as linhagens de células derivadas a partir de um câncer.

[0092] O câncer pode ser associado com uma variedade de sintomas físicos. Os sintomas do câncer geralmente dependem do tipo e da localização do tumor. Por exemplo, o câncer do pulmão pode causar tosse, falta de ar e dor no peito, enquanto o câncer de cólon, muitas vezes, provoca diarreia, constipação e sangue nas fezes. No entanto, para dar apenas alguns exemplos, os seguintes sintomas muitas vezes são geralmente associados com muitos tipos de cânceres: febre, calafrios, suores noturnos, tosse, dispnéia, perda de peso, perda de apetite, anorexia, náuseas, vômitos, diarréia, anemia, icterícia, hepatomegalia, hemoptise, fadiga, mal-estar, alterações cognitivas, depressão, distúrbios hormonais, neutropenia, dor, feridas que não cicatrizam, aumento dos gânglios linfáticos, neuropatia periférica, e disfunção sexual.

[0093] Em um aspecto da invenção, um Uso para o tratamento de câncer (por exemplo câncer da mama ou da próstata) é fornecido. Em algumas modalidades, o tratamento do câncer compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de polipeptídeos de p62 e ácidos nucleicos que codificam p62 a um sujeito em necessidade dos mesmos, em tais quantidades e durante um tempo conforme necessário para alcançar o resultado desejado. Em certas modalidades da presente invenção, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma partícula alvo inventiva é a quantidade eficaz para tratar, aliviar, melhorar, atenuar, retardar o início de, inibir a progressão de, reduzir a gravidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas ou características de câncer.

[0094] Em um aspecto da invenção, um Uso para a administração de polipeptídeos de p62 e ácidos nucleicos que codificam p62 a um sujeito que sofre de câncer (por exemplo, câncer da mama) ou tem recorrência de câncer é fornecido. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 são administrados a um sujeito em quantidades tais e durante um tempo conforme necessário para alcançar o resultado desejado (por exemplo, tratamento de câncer). Em certas modalidades da presente invenção, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de polipeptídeos de p62 e ácidos nucleicos que codificam p62 é a quantidade eficaz para tratar, aliviar, melhorar, atenuar, retardar o início de, inibir a progressão de, reduzir a gravidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas ou características de câncer. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos

que codificam p62 da invenção são administrados a um sujeito previamente tratado para câncer. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 da invenção são administrados a um sujeito com uma história familiar de câncer. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 da invenção são administrados a um sujeito com uma predisposição para o câncer. Por exemplo, um sujeito que é BRCA-positivo é geneticamente predisposto a certas formas de câncer de mama.

[0095] Os protocolos terapêuticos inventivos incluem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 para um indivíduo saudável (isto é, um sujeito que não apresenta quaisquer sintomas de câncer e/ou que não tenha sido diagnosticado com câncer). Por exemplo, os indivíduos saudáveis podem ser "imunizados" com polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 antes do desenvolvimento de câncer e/ou aparecimento de sintomas de câncer; em indivíduos em risco (por exemplo, pacientes que têm uma história familiar de câncer, pacientes portadores de uma ou mais mutações genéticas associadas com o desenvolvimento de câncer, pacientes que têm um polimorfismo genético associado com o desenvolvimento de câncer, pacientes infectados por um vírus associado ao desenvolvimento de câncer; pacientes com hábitos e/ou estilos de vida associados ao desenvolvimento do câncer; etc.) podem ser tratados substancialmente contemporaneamente com (por exemplo, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, ou dentro de 12 horas) do aparecimento

de sintomas de câncer. Claro que os indivíduos conhecidos como tendo câncer podem receber o tratamento da invenção, em qualquer momento.

[0096] Em outras modalidades, os polipeptídeos de p62 ou ácidos nucleicos que codificam p62 da presente invenção podem ser utilizados para inibir o crescimento de células cancerígenas, por exemplo, células de câncer da mama. Tal como usado aqui, o termo "inibe o crescimento de células de câncer" ou "inibir o crescimento de células de câncer" refere-se a qualquer diminuição da taxa de proliferação e/ou migração de células de câncer, prisão de proliferação e/ou migração de células de câncer, ou a morte das células de câncer, de tal modo que a taxa de crescimento das células do câncer é reduzida em comparação com a taxa observada ou prevista de crescimento de uma célula de câncer de controle não tratado. O termo "inibe o crescimento" pode também referir-se a uma redução no tamanho ou desaparecimento de uma célula de câncer ou de tumor, bem como a uma redução do seu potencial metastático. De preferência, tal inibição ao nível celular pode reduzir o tamanho, impedir o crescimento, reduzir a agressividade, ou prevenir ou inibir a metástase de um câncer em um paciente. Os versados na técnica podem prontamente determinar, por qualquer um de uma variedade de sinais adequados, se o crescimento de células de câncer é inibido.

[0097] A inibição do crescimento de células de câncer pode ser evidenciada, por exemplo, por captura de células de câncer em uma fase particular do ciclo celular, por exemplo, parada na fase de G2/M do ciclo celular. A inibição do crescimento das células do câncer também pode

ser evidenciada pela medição direta ou indireta de células de câncer ou tamanho do tumor. Em pacientes com câncer humanos, tais medidas geralmente são feitas usando Usos de imagem bem conhecidos, tais como imagem de ressonância magnética, tomografia axial computadorizada e raios-X. O crescimento de células do câncer também pode ser determinado indiretamente, tal como por meio da determinação dos níveis de circulação de antígeno carcinoembrionário, antígeno específico da próstata ou outros antígenos específicos de câncer que estão correlacionados com o crescimento de células de câncer. A inibição do crescimento do câncer é também geralmente correlacionada com a sobrevivência prolongada e/ou saúde aumentada e bem-estar do sujeito.

[0098] Os compostos e composições aqui descritos podem ser administrados como um fármaco ou medicamento formulado com um carreador farmacologicamente aceitável. Por conseguinte, os compostos e composições podem ser utilizados na fabricação de um medicamento ou composição farmacêutica. As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas como soluções ou pós liofilizados para administração parentérica. Os pós podem ser reconstituídos por adição de um diluente adequado ou outro carreador farmacologicamente aceitável antes do uso. As formulações líquidas podem ser soluções tamponadas, isotônicas, aquosas. Os pós podem também ser pulverizados na forma seca. Exemplos de diluentes adequados são solução salina isotônica normal, dextrose padrão a 5% em água, ou solução de acetato de sódio ou de amônio tamponada. Tais formulações são particularmente adequadas para

administração parenteral, mas podem também ser usadas para administração oral ou estar contidas em um inalador de dose medida ou nebulizador para insuflação. Pode ser desejável adicionar excipientes tais como polivinilpirrolidona, gelatina, hidróxi celulose, acácia, polietileno glicol, manitol, cloreto de sódio, citrato de sódio, e semelhantes.

[0099] Em alternativa, os compostos e composições podem ser encapsulados, comprimidos ou preparados em uma emulsão ou xarope para administração oral. Os carreadores sólidos ou líquidos farmacêuticamente aceitáveis podem ser adicionados para realçar ou estabilizar a composição, ou para facilitar a preparação da composição. Os carreadores sólidos incluem amido, lactose, sulfato de cálcio di-hidratado, terra alba, estearato de magnésio ou ácido esteárico, talco, pectina, acácia, agar ou gelatina. Os carreadores líquidos incluem xarope, óleo de amendoim, azeite, soro fisiológico e água. O carreador pode também incluir um material de liberação sustentada tal como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila, sozinho ou com uma cera. A quantidade de carreador sólido varia mas, preferencialmente, estará entre cerca de 20 mg a cerca de 1 g por unidade de dosagem. As preparações farmacêuticas são feitas seguindo as técnicas convencionais de farmácia envolvendo moagem, mistura, granulação e compressão, quando necessário, para formas de comprimido; ou moagem, mistura e enchimento para formas de cápsula de gelatina dura. Quando um carreador líquido é utilizado, a preparação pode ser na forma de um xarope, elixir, emulsão ou uma suspensão aquosa ou não aquosa. Para administração retal, os compostos da invenção podem ser combinados com

excipientes tais como manteiga de cacau, glicerina, gelatina ou polietileno glicóis e moldados em um supositório.

[0100] Os compostos e composições podem ser formulados para incluir outros fármacos clinicamente úteis ou agentes biológicos. Os compostos e composições também podem ser administrados em conjunto com a administração de outros fármacos ou agentes biológicos úteis para a doença ou condição para as quais os compostos e composições da invenção são dirigidos.

[0101] Como aqui empregada, a frase "uma quantidade eficaz", refere-se a uma dose suficiente para fornecer concentrações suficientemente elevadas para conferir um efeito benéfico sobre o seu receptor. O nível de dose terapêuticamente eficaz específico para qualquer sujeito particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo o distúrbio a ser tratado, a gravidade da doença, a atividade do composto específico, ou a composição, a via de administração, a taxa de depuração do composto ou composição, a duração do tratamento, fármacos utilizados em combinação ou coincidentes com o composto ou composição, a idade, peso corporal, sexo, dieta, e estado geral de saúde do sujeito, e de fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas e ciências médicas. Vários aspectos gerais considerados para determinar a "quantidade terapêuticamente eficaz" são conhecidos dos versados na técnica e são descritos, por exemplo, em Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8º ed., Pergamon Press, 1990; e Remington's Pharmaceutical Sciences, 17º ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990.

Os níveis de dosagem, normalmente, caem na faixa de cerca de 0,001 até 100 mg/kg/dia, com os níveis na faixa de cerca de 0,05 até 10 mg/kg/dia sendo geralmente aplicáveis. Um composto ou composição pode ser administrado por via parentérica, tal como por via intravascular, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraocular, intradérmica, subcutânea, ou semelhantes. A administração também pode ser por via oral, nasal, retal, transdérmica, intravaginal ou inalatoriamente através de um aerossol. Um composto ou composição pode ser administrado para o órgão que tem o tumor (ou o potencial alvo do tumor) ou no próprio tumor. O composto ou composição pode ser administrado como um bólus, ou infundido lentamente, ou ser administrado como uma via intradérmica, subcutânea, intramuscular, ou intraperitoneal.

[0102] Uma dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura de células por determinação do nível de expressão de p62 após a introdução de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de p62. Uma dose pode então ser formulada em modelos animais para se conseguir uma resposta imune adequada e/ou proteção contra o crescimento do tumor. Tal informação pode ser utilizada para determinar com maior precisão as doses iniciais úteis em humanos. A formulação exata, a via de administração e a dosagem podem ser escolhidas pelo médico do sujeito, tendo em vista a condição do paciente.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1. Construção do vetor e linhagens de células

[0103] Uma linhagem de células de tumor de mama 233

VSGA1, superexpressando oncogene HER/neu 2 de rato ativado foi derivada a partir de um carcinoma mamário de camundongo decorrente em camundongos transgênicos FVB/neu NT. Esta linhagem de células foi mantida conforme descrito (Nanni P, Pupa SM, Nicoletti G et al. Int J Cancer 2000;87:186). Células HeLa (ATCC # CCL-2.2™) foram propagadas em meio de crescimento completo de ATCC (ATCC MD-6108).

[0104] O domínio extracelular de HER2/neu de rato foi amplificado por PCR e clonado no vetor pcDNA3.1 (Invitrogen) como descrito ((FM Venanzi, A Barucca , K Havas, M Capitani , M Provinciali S Scotti , A Concetti. Vaccine 2010 (22); 3841-7).

[0105] Como uma fonte de DNAc que codifica p62, o RNA total foi extraído a partir de células HeLa. O cDNA de comprimento completo que codifica a isoforma mais longa de p62 (Variante 1 de Transcrito, referência de GenBank NP_003891 N) foi amplificado por PCR (Kit Qiagen de polimerase HotStar HiFidelity) usando os seguintes iniciadores: FW: 5-CCCGCTAGCATGGCGTCGCTCACCGTG-3 e REV: 5'-CCCAAGCTTTCACAACGGCGGGGGATGCTTTG-3'. Os produtos de PCR foram purificados e os fragmentos digeridos Nhe I - Hind III clonados em pcDNA3.1.

[0106] As sequências de DNA de p62 inseridas foram confirmadas por sequenciação (MGWBiotech/M-medical, Martinsried, Alemanha). Observou-se que o polipeptídeo codificado diferia da sequência de aminoácidos tipo selvagem por duas mutações de substituição: C145R e Q418R.

EXEMPLO 2. Efeito antitumoral preventivo da imunização de p62 em um modelo de câncer de mama de camundongo.

[0107] Camundongos FVB/N foram divididos em três

grupos (15 camundongos por grupo) foram imunizados com:

1. pcDNA.3.1 (vetor de plasmídeo vazio, controle negativo);

2. pcDNA.3.1 com pHER2 (controle positivo); ou,

3. pcDNA.3.1 com p62 (experimento).

[0108] FVB/N fêmeas foram anestesiadas e, após a exposição dos quadríceps femoral, injetadas com 100 µg de DNA (1mg/ml) em solução salina utilizando uma seringa de insulina. Os camundongos foram imunizados duas vezes (em 4 e em 2 semanas antes do desafio com o tumor). Os camundongos foram desafiados por via intradérmica com 3×10^5 células tumorais 233-VSGA1/100 µl de tampão PBS no flanco. Em todos os casos, os tumores foram medidos, determinando dois diâmetros perpendiculares com um paquímetro três vezes por semana. Os camundongos foram sacrificados quando os tumores ulceraram ou atingiram 1 cm em qualquer diâmetro.

[0109] 100% de camundongos vacinados com o vetor de plasmídeo vazio (controle negativo) desenvolveram tumores por dia 13 após o desafio. A vacinação com plasmídeo de codificação de HER2 deu uma proteção de 40% (FIG. 4). Ao mesmo tempo, o plasmídeo que codifica p62 demonstrou 100% de proteção no dia 13, que gradualmente reduziu para 70%. Conseqüentemente, o efeito protetor do plasmídeo que codifica p62 em um modelo do camundongo com câncer de mama transplantável foi demonstrado. Portanto, o efeito preventivo da vacina de p62 foi demonstrado para o câncer da mama em um modelo de camundongo. Os inventores acreditam que 100% de proteção poderia ser mantida se as vacinas fossem continuadas.

[0110] Os animais que foram imunizados com o vetor

plasmídeo de codificação quer de HER2 ou de p62 e não desenvolveram tumores após o primeiro desafio com células de câncer foram administrados com a mesma quantidade de células de câncer no dia 50. Todos os animais vacinados com plasmídeo de codificação de HER2 desenvolveram tumores, enquanto que nenhum tumor apareceu nos animais vacinados com p62. Conseqüentemente, a imunização com p62 manteve memória imunológica, enquanto que HER2 não.

EXEMPLO 3: Vacina de p62 estimula a imunidade inata

[0111] Os tumores nos camundongos que receberam a vacina de p62 continham grandes zonas de necrose (FIG. 5). As células imunológicas associadas com a inflamação estão abundantemente presentes dentro das áreas de necrose.

[0112] A vacina de HER2 induz a resposta imune adaptativa específica de antígeno e a migração massiva de linfócitos (células CD3+, linfócitos infiltrantes de tumores) no tumor (FIG. 6). Ao mesmo tempo, a vacinação com o plasmídeo p62 não aumentou significativamente o nível de linfócitos infiltrante de tumores. Pelo contrário, a injeção de plasmídeo p62, mas não da vacina de HER2, aumentou o nível de células CD11B+ no tumor (FIG 6). Conseqüentemente, a vacina p62 atua por estimulação da imunidade inata, ao contrário da vacina de HER2.

EXEMPLO 4: Demonstração da atividade antitumoral de vacina de DNA de p62 em modelo de câncer de mama ratos T5

[0113] O câncer de mama de rato transplantável T5 foi derivado de um adenocarcinoma da glândula mamária espontâneo de um rato Wistar em R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of National Academy of Sciences da Ucrânia. Ratas Wistar de

dois meses de idade (peso 130-150 g, 10 animais por grupo) foram desafiadas com carcinoma da glândula mamária de rato T5 por injeção subcutânea de $2,5 \times 10^6$ células tumorais/rato em 0,4 mL de PBS. A partir do dia seguinte, após o transplante do tumor, as ratas foram vacinadas três vezes, uma vez por semana (FIG. 7). Cada injeção continha 78 µg de pcDNA.3.1 (vetor de plasmídeo vazio, controle negativo) ou pcDNA.3.1 com p62 (experimento).

[0114] O crescimento tumoral foi inibido por imunização com p62 (FIG. 8) com uma inibição do crescimento do tumor de 70% em ratos vacinados com p62 em comparação com os ratos de controle injetados com vetor ($p < 0,004$) (FIG. 9).

[0115] A sobrevivência de ratos implantados com tumor (8 vetores- e 8 p62-imunizados) foi monitorada durante 75 dias. 50% dos animais no grupo de controle morreram enquanto não houve mortes de animais no grupo vacinado com p62 (Figura 10).

[0116] A análise histológica dos tumores revelou zonas necrosadas (FIG. 11). A necrose intratumoral em ratos que receberam a vacina de DNA de p62 foi semelhante a observada nos tumores de camundongos que receberam a vacina de DNA de p62 (FIG. 12).

[0117] Conseqüentemente, o efeito antitumor de vacinas de DNA de p62 foi demonstrado no segundo modelo animal (rato), indicando que a vacina de DNA de p62 pode ser usada para tratar o câncer da mama.

EXEMPLO 5. Potência antimetastática de vacina de DNA de p62.

[0118] O carcinoma pulmonar de Lewis é um modelo

oficialmente aceito pelo Pharmacological Committee of Russian Federation (Comité Farmacológico da Federação Russa) "FDA da Rússia", para testar fármacos para efeitos antimetastáticos. 100 µg do plasmídeo foram injetados por via intramuscular em camundongos a cada 4 semanas e 2 semanas antes do desafio com o transplante do tumor, bem como 1, 8 e 15 dias após o desafio. Foram utilizados quinze animais por grupo. A FIG. 13 mostra que a vacinação com p62 reduziu o número de metástases nos pulmões em 50% em relação ao controle.

[0119] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um comum versado na técnica à qual esta invenção pertence.

[0120] As invenções aqui descritas de forma ilustrativa podem ser adequadamente praticadas na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não sejam especificamente aqui divulgados. Assim, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo", "contendo", etc. devem ser lidos expansivamente e sem limitação. Além disso, os termos e expressões usados aqui foram usados como termos de descrição e não de limitação, e não há nenhuma intenção, no uso de tais termos e expressões, de excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou suas porções, mas é reconhecido que são possíveis várias modificações dentro do escopo da invenção reivindicada.

[0121] Deste modo, deve ser entendido que embora a invenção tenha sido especificamente descrita por modalidades preferidas e características opcionais, a

modificação, melhoria e variação das invenções incorporadas na mesma aqui divulgada podem ser invocadas por aqueles versados na técnica, e que tais modificações, melhorias e variações são consideradas como estando dentro do escopo da presente invenção. Os materiais, Usos e exemplos aqui apresentados são representativos das modalidades preferidas, são exemplares e não pretendem ser limitações do escopo da invenção.

[0122] A invenção foi descrita de forma ampla e genérica aqui. Cada uma das espécies mais estreitas e grupos subgenéricos que caem dentro da descrição genérica também fazem parte da invenção. Isto inclui a divulgação genérica da invenção com a condição ou limitação negativa que remove qualquer matéria do gênero, independentemente de se o material retirado é ou não especificamente aqui recitado.

[0123] Além disso, onde as características ou aspectos da invenção são descritos em termos de grupos de Markush, os versados na técnica irão reconhecer que a invenção também é, assim, descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo de Markush.

[0124] Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui mencionadas são expressamente incorporadas por referência na sua totalidade, na mesma extensão como se cada uma fosse incorporada por referência individualmente. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, prevalecerá.

[0125] A descrição anterior destina-se apenas a transmitir uma compreensão da presente invenção para

aqueles versados na técnica, e não se destina a ser limitativa. Deve ser apreciado que várias modificações às modalidades descritas são possíveis, sem distanciamento do escopo da invenção. Portanto, o escopo da presente invenção deve ser interpretado apenas por referência às reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um polipeptídeo p62, ou de um ácido nucleico que codifica p62, **caracterizado** pelo fato de ser na preparação de um agente para tratar, aliviar, melhorar, atenuar, retardar o início de, inibir a progressão de, reduzir a gravidade de, e/ou reduzir a incidência de um ou mais sintomas de um câncer em um sujeito.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido agente compreende:

a. uma ou mais deleções de domínio;

b. em que o referido ácido nucleico que codifica p62 é pelo menos 95% idêntico à SEQ ID NO: 1, ou

c. em que o referido polipeptídeo de p62 é pelo menos 98% idêntico à SEQ ID NO: 2.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a referida uma ou mais deleções de domínio são selecionadas a partir do grupo que consiste em: PB1, ZZ, NLS2, TB, NLS1, NES, LIR, KIR, e UBA.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o referido polipeptídeo p62 ou ácido nucleico que codifica p62 compreende ainda um polipeptídeo de fusão ou ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de fusão, respectivamente.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o referido polipeptídeo p62 é modificado pós-traducionalmente.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o referido polipeptídeo p62 é modificado pós-traducionalmente *in vitro*.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o referido agente é administrado por qualquer uma das vias selecionadas do grupo consistindo em: parenteralmente, oralmente, nasalmente, retalmente, transdermicamente, intravaginalmente ou inalatóriamente através de um aerossol.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o referido agente é administrado por qualquer uma das vias selecionadas do grupo consistindo em: intravascularmente, intravenosamente, intra-arterialmente, intramuscularmente, intraocularmente, intradermicamente e subcutaneamente.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o referido agente é administrado a um órgão ou a um tumor.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a administração de um adjuvante ao referido sujeito.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o referido adjuvante é selecionado a partir do grupo que consiste em: adjuvantes tipo gel, microbiano, particulado, de emulsão de óleo, à base de surfactante, e sintético.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a administração de um ou mais componentes coestimuladores.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o referido um ou mais componentes coestimuladores é selecionado a partir do grupo que consiste em: proteínas de superfície celular,

citocinas, quimiocinas, e moléculas de sinalização.

14. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a administração de uma ou mais moléculas que bloqueiam os mecanismos imunes reguladores negativos ou supressivos.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a referida uma ou mais moléculas que bloqueiam os mecanismos imunes reguladores supressivos ou negativos é selecionada a partir do grupo que consiste em: anticorpo anti-CTLA-4, anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-CD4, e proteína de fusão IL13Ra2-Fc.

16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a administração de uma ou mais terapias anticâncer ao referido sujeito.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a referida uma ou mais terapias anticâncer é selecionada a partir do grupo que consiste em: uma molécula quimioterapêutica, radiação, e uma molécula antiangiogênica.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a referida molécula quimioterapêutica é selecionada a partir do grupo que consiste em: ciclofosfamida, doxorrubicina, paclitaxel, docetaxel, navelbina, capecitabina, e mitomicina C.

19. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **caracterizado** pelo fato de que o referido câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em: câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer gástrico, câncer colorretal, câncer de pele, um câncer da

cabeça e do pescoço, câncer dos brônquios, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer do cérebro, câncer do sistema nervoso central, câncer do sistema nervoso periférico, câncer de esôfago, câncer da cavidade oral ou faringe, câncer de fígado, câncer de rim, câncer de testículo, câncer do trato biliar, câncer do intestino delgado ou de apêndice, câncer de ovário, câncer de útero, câncer da glândula salivar, câncer de tireóide, câncer da glândula adrenal, osteossarcoma, condrossarcoma, sarcoma e câncer dos tecidos hematológicos.

20. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado** pelo fato de que o referido sujeito é selecionado a partir do grupo que consiste em: um sujeito previamente tratado para o câncer, um sujeito com uma história familiar de câncer, e um sujeito com predisposição para o câncer.

21. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que o referido agente compreende um ácido nucleico que codifica p62, em que o referido ácido nucleico que codifica p62 é pelo menos 95% idêntico à SEQ ID NO: 1, e em que o referido ácido nucleico que codifica p62 compreende ainda um plasmídeo ou um vetor viral.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma estratégia para melhorar a eficiência de imunização à base de ácido nucleico.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a referida estratégia é selecionada a partir do grupo que consiste em: replicons de

autorreplicação viral, otimização de códon, eletroporação *in vivo*, incorporação de motivos estimuladores CpG, sequências para alvo das vias de processamento de ubiquitina ou endocíticas, sequências VP22 tipo 1 do vírus da doença de Marek, regime de reforço de iniciador, e o uso de vetores de distribuição da mucosa.

```

1 cctctcgagg cggggcgggg cctccgctt cgctacaaa gccgcgccc ggctgcgacc
61 gggacggccc gttttccgcc agctcgccgc tcgctatggc gtcgctcacc gtgaaggcct
121 accttctggg caaggaggac ggggcgccc agattcgccg cttcagcttc tgctgcagcc
181 ccgagcctga ggcggaagcc gaggtcgccg cgggtccggg acctcgcgag cggtctgta
241 gccgggtggc cgccctgttc cccgcgctgc ggctggcgg cttccaggcg cactaccgcg
301 atgaggacgg ggacttggtt gccttttcca gtgacgagga attgacaatg gccatgtcct
361 acgtgaagga tgacatcttc cgaatctaca ttaaagagaa aaaagagtgc cggcgggacc
421 accgcccacc gtgtgctcag gaggcgcccc gcaacatggt gcacccaat gtgatctgcy
481 atggctgcaa tgggctgtg gttagaaccc gctacaagtg cagcgtctgc ccagactacg
541 acttgtgtag cgtctgcgag ggaaggggct tgcaccgggg gcacaccaag ctgcattcc
601 ccagccctt cgggacactg tctgagggct tctcgcacag ccgctggctc cgaagggtga
661 aacacggaca cttcgggtgg ccaggatggg aaatgggtcc accaggaac tggagccac
721 gtccctctg tgcaggggag gcccgcctg gcccacggc agaatcagct tctggtccat
781 cggaggatcc gagtgtgaat ttccctgaaga acgttgggga gactgtggca gctgccctta
841 gccctctggg cattgaagtt gatatcgatg tggagcacgg agggaaaaga agccgctga
901 cccccgtctc tccagagagt tccagcacag aggagaagag cagctcacag ccaagcagct
961 gctgctctga ccccagcaag cgggtggga atgttgaggg cggcacgag tctctggcg
1021 agcagatgag gaagatcgcc ttggagtccg agggcgccc tgaggaacag atggagtccg
1081 ataactgttc agggagagat gatgactgga cccatctgtc ttcaaaagaa gtggaccgct
1141 ctacagtgta actccagtcc ctacagatgc cagaatccga agggccaagc tctctggacc
1201 cctcccagga gggaccaca gggctgaagg aagctgcctt gtaccacat ctcccgcag
1261 aggctgacct gcggctgatt gactccctct cccagatgct gtccatgggc ttctctgatg
1321 aaggcgctg gctcaccagg ctccctgcaga ccaagaacta tgacatcgga gcgctctgg
1381 acaccatcca gtattcaaag catccccgcg cgttgtgacc acttttgccc acctctctg
1441 cgtgcccctc ttctgtctca tagttgtgtt aagcttgcgt agaattgcag gtctctgtac
1501 gggccagttt ctctgccttc ttccaggatc aggggttagg gtgcaagaag ccatttaggg
1561 cagcaaaaca agtgacatga agggagggtc cctgtgtgtg tgtgtgctga tgtttctgg
1621 gtgccctggc tccctgcagc agggctgggc ctgagagacc caaggctcac tgcagcgcg
1681 tccctgcccc tccctgcagg ggctacgtta gcagcccagc acatagcttg cctaattgct
1741 ttcactttct cttttgtttt aaatgactca taggtccctg acatttagt gattattttc
1801 tgctacagac ctggtacact ctgattttag ataaagtaag cctaggtgtt gtcagcaggc
1861 aggctgggga ggccagtgtt gtgggcttcc tgctgggact gagaaggctc acgaagggca
1921 tccgcaatgt tggtttcaact gagagctgcc tccctggctc ttcaccactg tagttctctc
1981 atttccaaac catcagctgc ttttaaaata agatctctt gtagccatcc tgttaaattt
2041 gtaacaatc taattaaatg gcatcagcac ttaaccaat gacgtttgca tagagagaaa
2101 tgattgacag taagtttatt gttaatggtt cttacagagt atcttataaa gtgccttagg
2161 ggaaccctgt ccctcctaac aagtgtatct cgattaataa cctgccagtc ccagatcaca
2221 catcatcctc gaagtcttcc ccagttataa agaggtcaca tagtctgtg ggctcaggat
2281 tctgtgcctc caggaccagg gggccacct ctgccaggg agtccctgcy tccatgagg
2341 tcttccgca aggcctctca gaccagatg tgacgggtg tgtggcccga ggaagctgga
2401 cagcggcagt gggcctgctg aggccttctc ttgaggcctg tgcctcggg gtccctgct
2461 tagcctgtgc tggaccagct ggcctggggt ccctctgaag agacctggc tgctcactgt
2521 ccacatgtga actttttcta ggtggcagga caaattgcgc ccatttagag gatgtggctg
2581 taacctgctg gatgggactc catagctcct tcccaggacc cctcagctcc ccggcactgc
2641 agtctgcaga gttctctgg aggcaggggc tgcctgctt ttcacctc catgtcaggc
2701 cagcctgtcc ctgaaagaga agatggccat gccctccatg tgtaagaaca atgccagggc
2761 ccaggaggac cgcctgcct gcctgggct tggctgggct tctggtctg acactttctg
2821 ctggaagctg tcaggctggg acaggctttg attttgaggg ttagcaagac aaagcaata
2881 aatgccttcc acctcaccgc aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa (SEQ ID NO: 1)

```

FIG. 1

1 masltvkayl lgkedaarei rrfsfccspe peaeaeaaag pgpcerllsr vaalfpalrp
61 ggfqahyrde dgdlvafssd eeltmamsyv kddifriyik ekkecrrdhr ppcaqeaprn
121 mvhpnvicdg cngpvvgtry kcsvcpydl csvcegkglh rghtklafps pfghlsegfs
181 hsrwlrkvkh ghfgwpgwem gppgnwsprp pragearpgp taesasgpse dpsvnflknv
241 gesvaaalsp lgievdivve hggkrsrltp vspessstee ksssqspsc sdpskpggnv
301 egatqslaeq mrkialeseg rpeeqmesdn csggdddwth lsskevdpst gelqslampe
361 segpssldps qegptglkea alyphlpea dprlieslsq mlsmgfsdeg gwltrllqtk
421 nydigaaldt iqyskhpppl (SEQ ID NO: 2)

FIG. 2

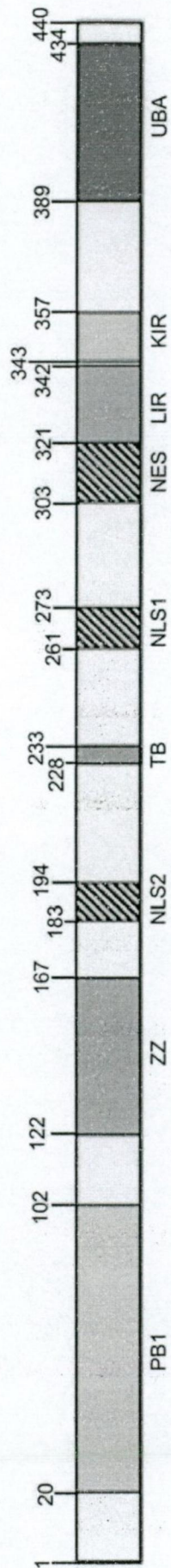


FIG. 3

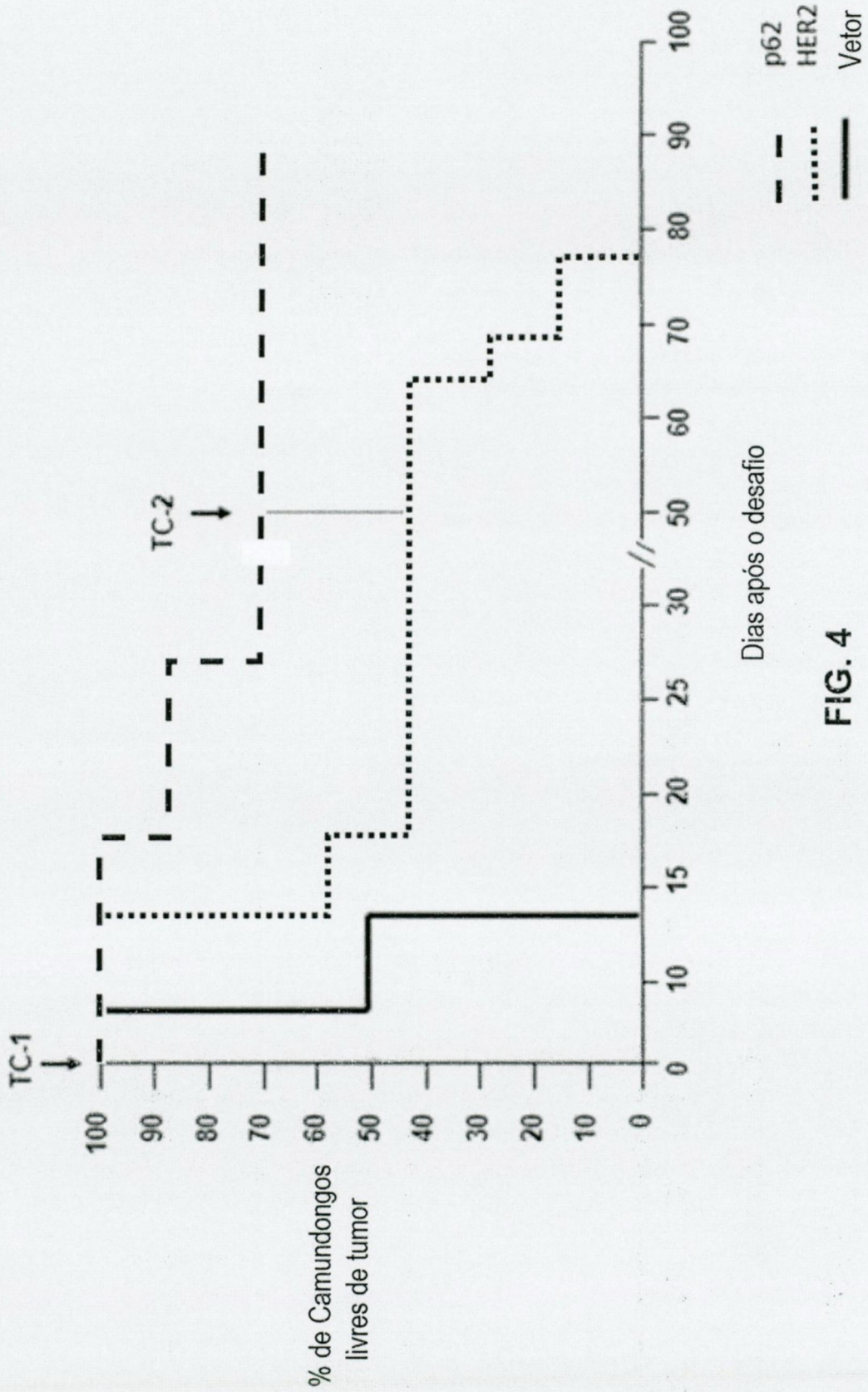


FIG. 4

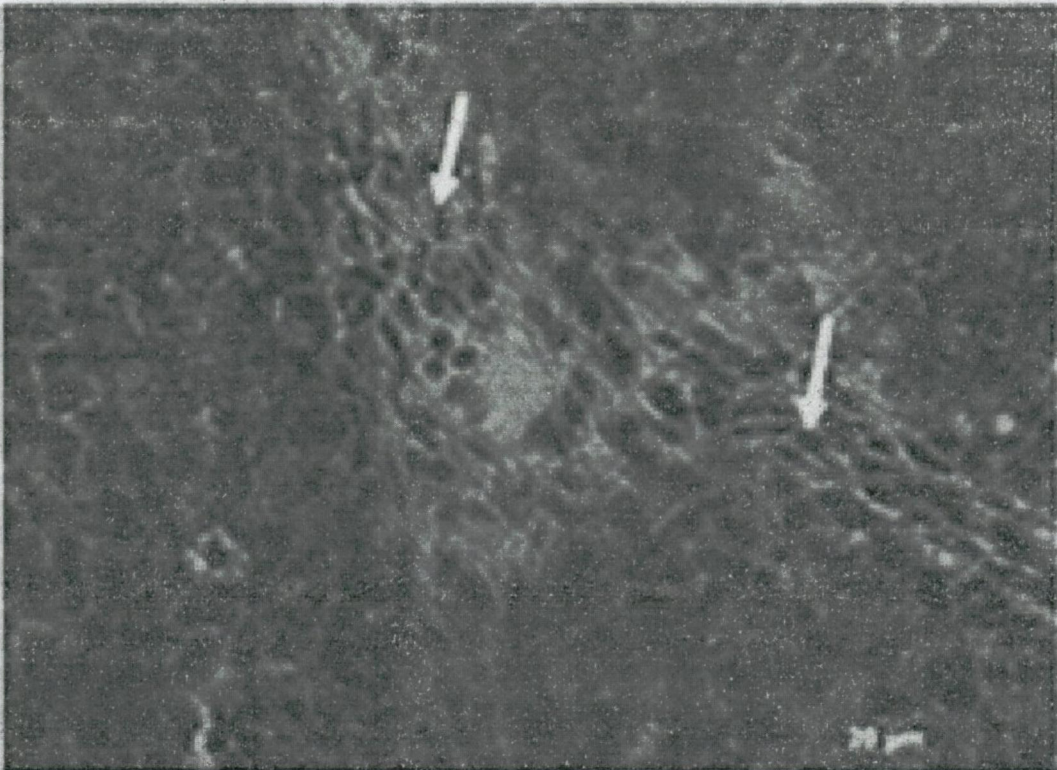
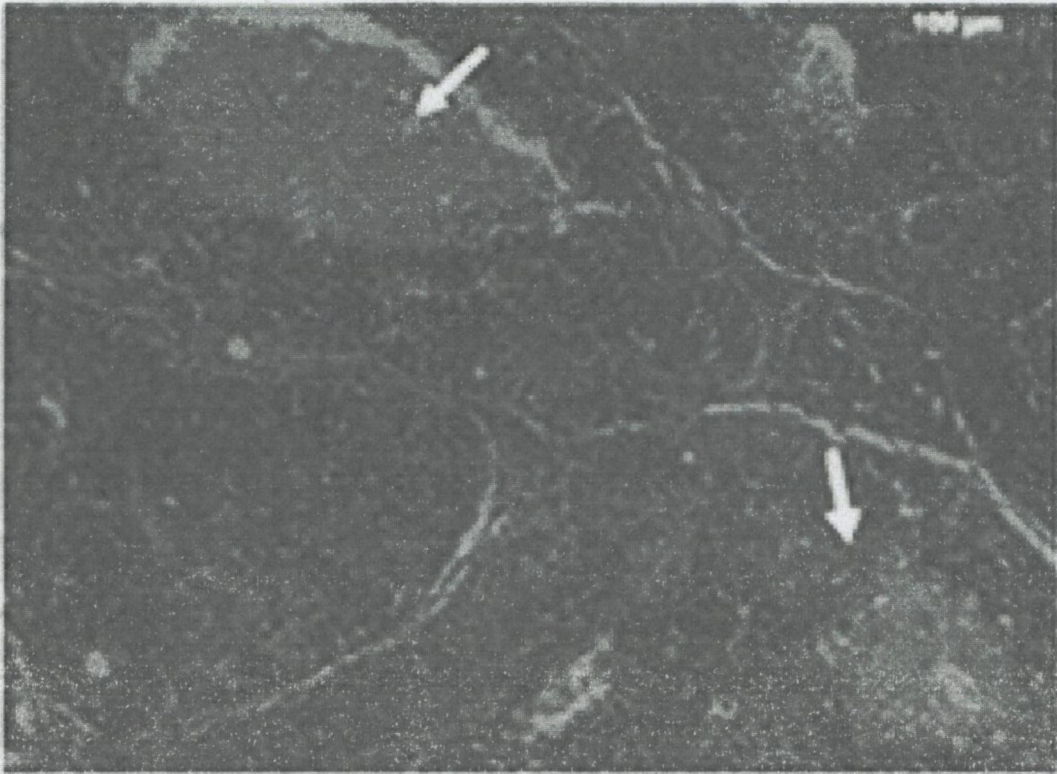


FIG. 5

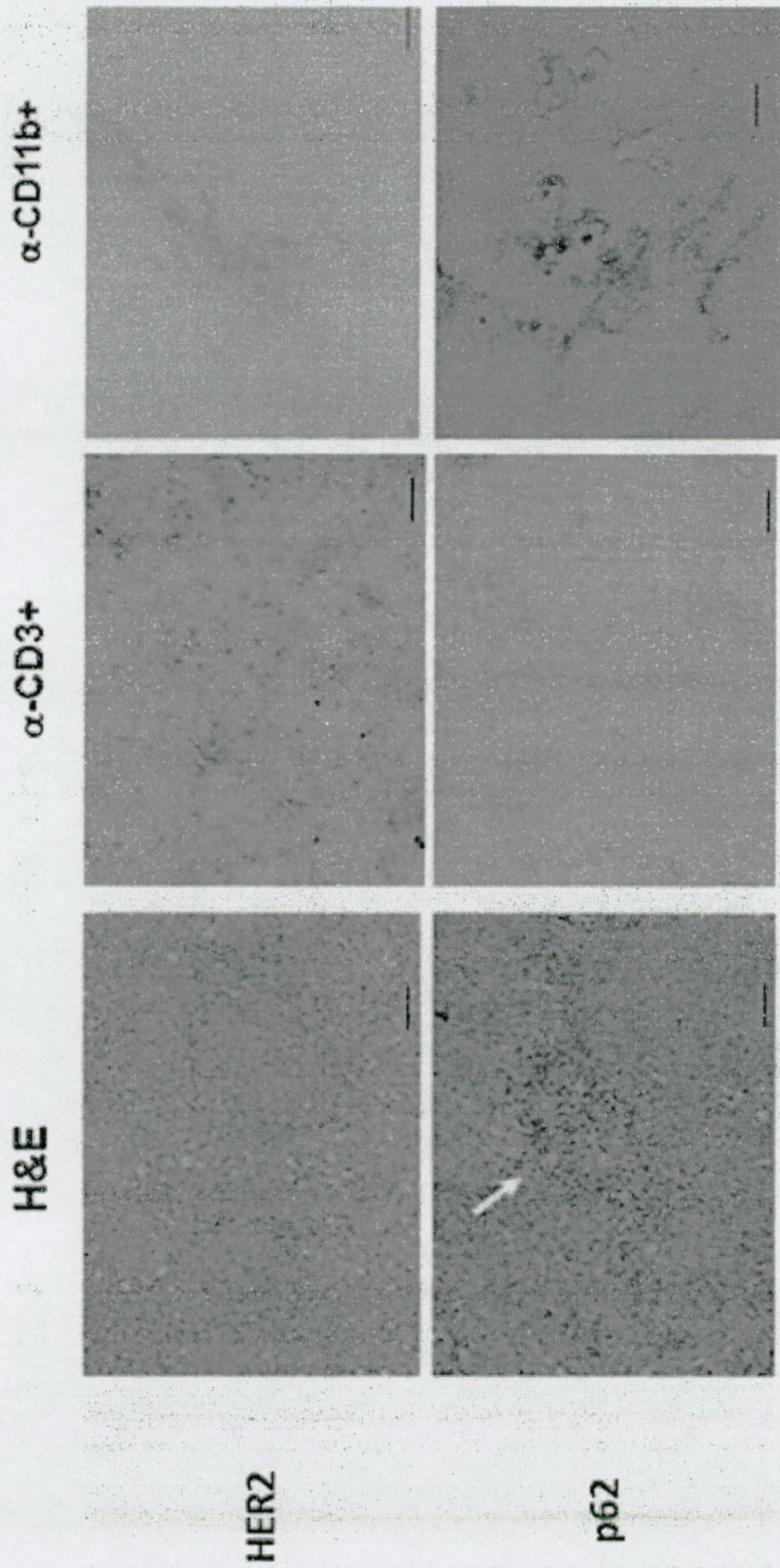


FIG. 6

Injeções i.m. Semanalmente de plasmídeos 70 ug/rato)

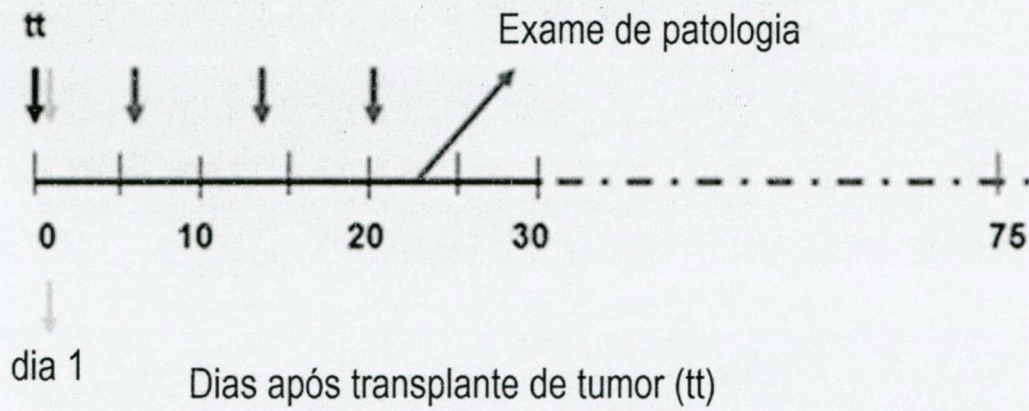


FIG. 7

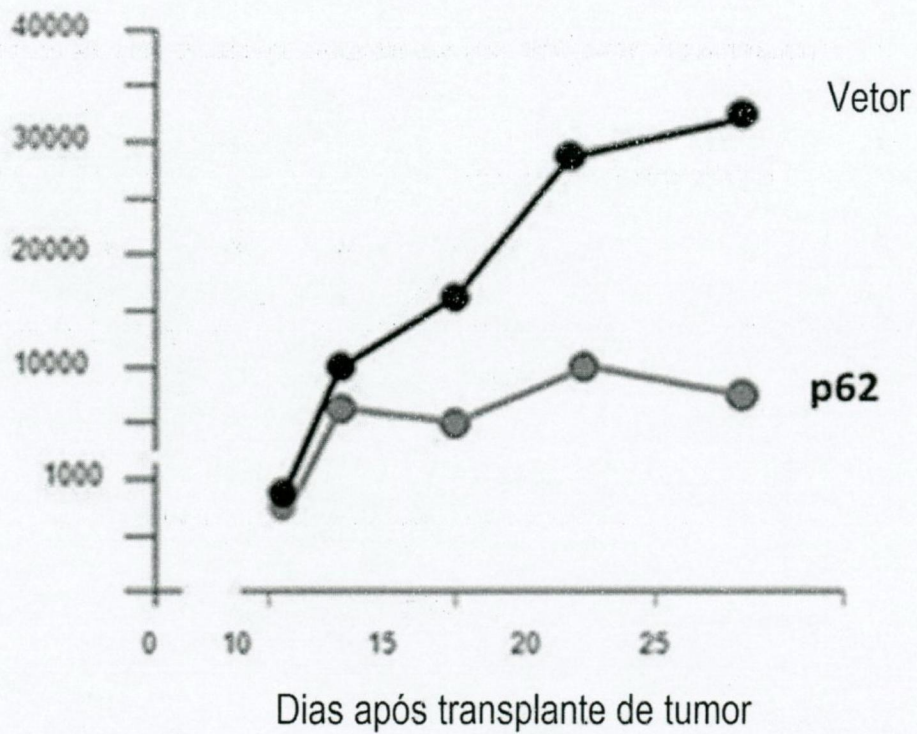
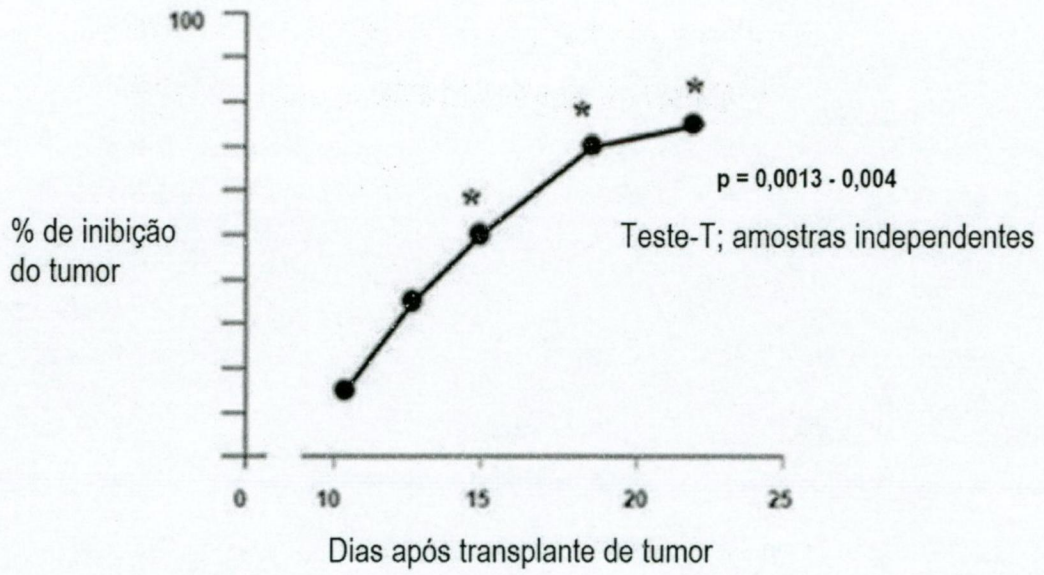


FIG. 8



% de inibição de tumor = (Controle de Volume de Tumor - Grupos p62 de Volume de Tumor)/Controle de Volume de Tumor x 100

FIG. 9

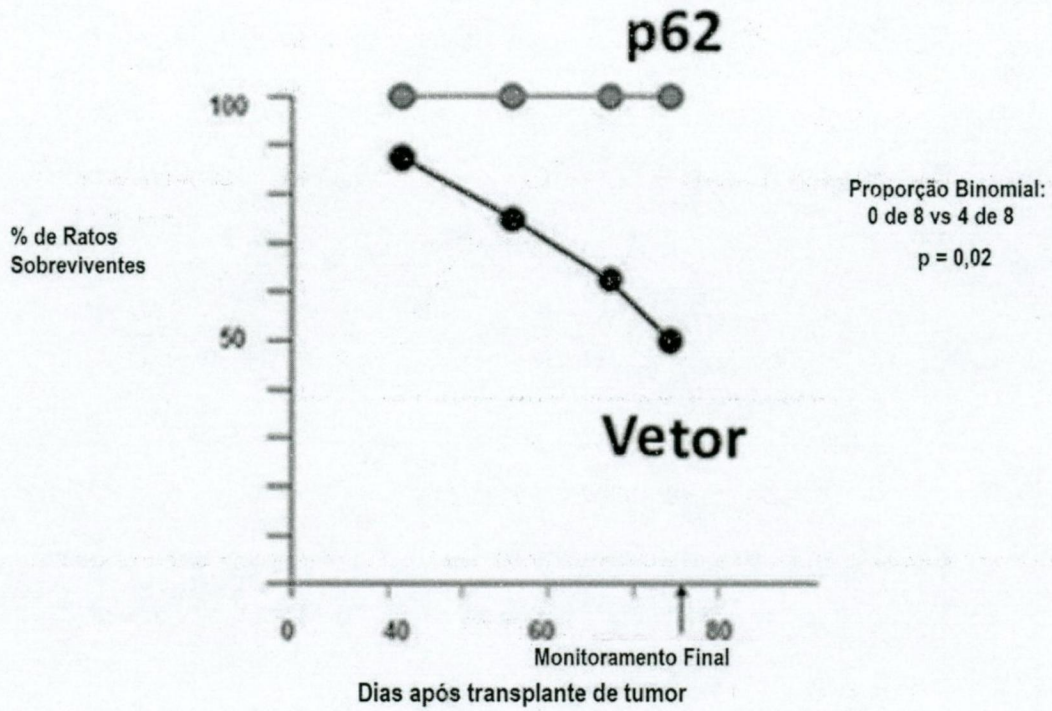


FIG. 10

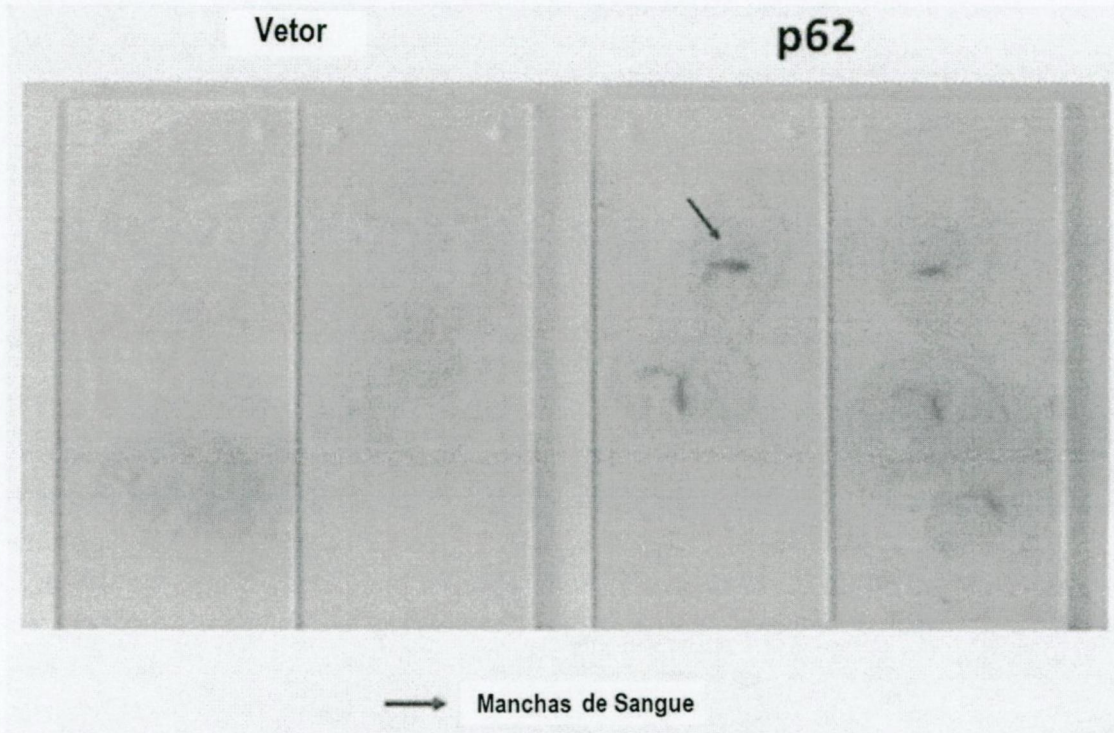


FIG. 11

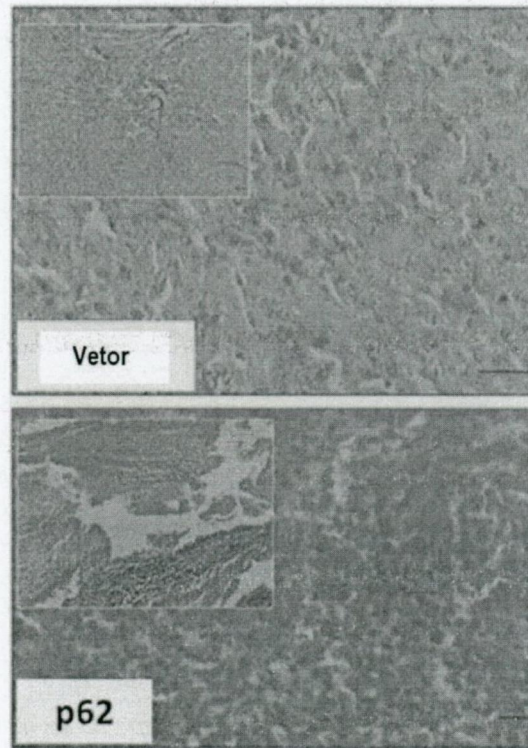


FIG. 12

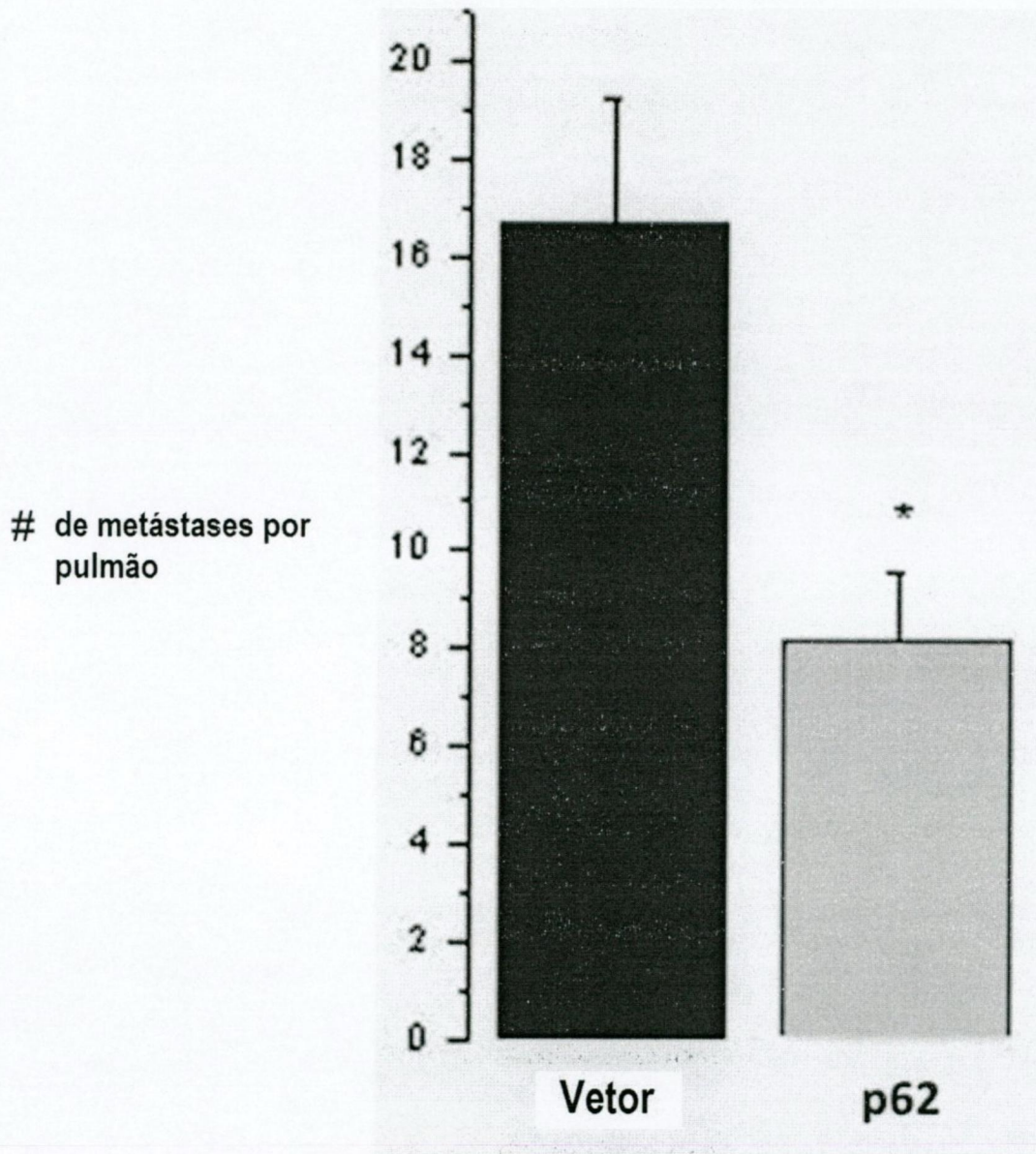


FIG. 13

RESUMO

**USO DE UM POLIPEPTÍDEO P62, OU DE UM ÁCIDO NUCLEICO QUE
CODIFICA P62**

São fornecidas aqui novas composições de p62 para a profilaxia e tratamento de câncer e usos relacionados. A invenção também fornece composições de p62 modificadas que aumentam a atividade anticâncer de p62.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201400079 - listagem [1.5].txt
- Data de Geração do Código: 23/08/2021
- Hora de Geração do Código: 14:03:07
- Código de Controle:
 - Campo 1: C3F7B8C01BA6BEA5
 - Campo 2: E84C6DCB8E9D116C